

# Expression bakterieller Phytasen in Pflanzen

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium**

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Biol. Kristin Dietel, geb. Rosner

geboren am 14.04.1977 in Rathenow

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Herr Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Lutz-Helmut Schön

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Rainer Borriß

2. Prof. Dr. Diter von Wettstein

3. Prof. Dr. Christof Engels

Tag der mündlichen Prüfung: 28.06.2010



## Zusammenfassung

Da die Verfügbarkeit des essentiellen Makroelementes Phosphor für die Lebewesen eingeschränkt ist, wurde die Verbesserung seiner Disponibilität ein Thema der Forschung. Besonders bei der Pflanzenproduktion und der Tierernährung spielte die Phosphorverfügbarkeit eine wichtige Rolle bei der ökonomischen Nutzung der Ressourcen. In den Fokus der Wissenschaft zur Lösung des Phosphorproblems gerieten die Phytasen seit der Erkenntnis, dass der Phosphor in größeren Mengen als Phytinsäure fest gebunden vorliegt. Später wurden verschiedene Methoden entwickelt die Phytasen industriell zu produzieren und in der Landwirtschaft einzusetzen. Mit Entwicklung der Gentechnik bietet sich nun seit einiger Zeit die Chance, neue Wege bei der Lösung des Phosphorproblems zu beschreiten. Die gentechnische Veränderung von Pflanzen stellt eine effiziente Möglichkeit zur Produktion von phosphatfreisetzenden Enzymen, zur Erhöhung der Biomasseproduktion und zur Veränderung der Inhaltstoffe dar.

In dieser Arbeit wurden erfolgreich transgene Pflanzen der Arten *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun und *Hordeum vulgare* L. cv. Golden Promise erzeugt, die in der Lage waren die saure Phytase aus *Klebsiella* sp. ASR1 bzw. die  $\beta$ -Propeller-Phytase aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 zu produzieren.

Es wurde für jedes Protein eine Strategie zur Reinigung des aktiven Enzyms aus den verschiedenen Wirtsorganismen entwickelt und seine biochemischen Eigenschaften charakterisiert. Es wurde gezeigt, dass die  $\beta$ -Propeller-Phytase aus *Bacillus* im Gegensatz zur sauren Phytase aus *Klebsiella* durch die posttranslationale Modifikation teilweise ihre Eigenschaften ändert, aber in allen Fällen als aktives Protein vorlag. Es wurden Aussagen über Temperaturverhalten, pH-Optimum, Thermostabilität, spezifische Aktivitäten und Substrataffinitäten der rekombinanten Phytasen im Vergleich mit den nativen Enzymen getroffen.

Die Auswirkungen der heterologen Expression der Phytasen auf die Veränderung der Anteile von Phytinsäure und anorganischem Phosphor, in Relation zum gesamten Phosphor, in den Samen von *Hordeum vulgare* L. cv. Golden Promise wurden untersucht. Es wurde eine Reduktion des Phytinsäuregehaltes um 19 % in den Samen nachgewiesen, die die saure Phytase aus *Klebsiella* enthielten. Alle transgenen Samen zeigten eine Erhöhung des Gehalts anorganischem Phosphor zwischen 27 % und 78 %.

Mit Hilfe von spezifischen Signalsequenzen gelang es die Phytaseproteine aus der Wurzel in das umgebende Medium zu sekretieren. Die Sekretion der Phytase aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 führte zu einer Steigerung der Biomasseproduktion von *Nicotiana tabacum* L. unter unsterilen Wachstumsbedingungen bei pH 7 auf Quarzsand mit Phytat als einziger P-Quelle um 34 % .



**Abkürzungsverzeichnis**

rpm	Umdrehungen pro Minute
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RT	Raumtemperatur
bp	Basenpaare
NHS	N-hydroxy-Succinimidester
SDS	Sodiumdodecylsulfat
ÜN	über Nacht
HP	Sepharose High Performance
SOE	spliced overlap extension
dest.	destilliert
cop	Codon-optimiert
SP-Sepharose	Sulphopropyl-Sepharose
CM-Sepharose	Carboxymethyl-Sepharose
Hv	<i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Golden Promise
Nt	<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Samsun
FZB45	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB45



# Inhaltsverzeichnis

## Zusammenfassung I

## Abkürzungsverzeichnis III

### 1 Einleitung 1

1.1 Der natürliche Phosphorkreislauf	1
1.2 Der Phosphorkreislauf in landwirtschaftlich genutzten Ökosystemen	2
1.3 Phosphor im Boden und seine Verfügbarkeit für Pflanzen	3
1.4 Akquisitionsstrategien und Anpassungen der Pflanzen an Phosphormangel	4
1.4.1 Phosphoraufnahme durch die Pflanze	5
1.5 Die Phytinsäure	6
1.5.1 Phytasen	8
1.5.1.1 Die $\beta$ -Propeller Phytase aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB45	9
1.5.1.2 Die saure Histidin-Phosphatase aus <i>Klebsiella</i> sp. ASR1	10
1.6 Heterologe Genexpression	11
1.6.1 Transgene Pflanzen	12
1.7 Zielstellung	13

### 2 Ergebnisse 15

2.1 Expression zweier bakterieller Phytasegene in Pflanzen	15
2.1.1 Heterologe Expression des Phytasegens <i>phyC</i> aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB45	15
2.1.1.1 Überprüfung der DNA-Sequenz von <i>phyC</i> bezüglich der Triplettnutzung von <i>Nicotiana tabacum</i> und <i>Hordeum vulgare</i> mit dem Programm GCUA 2.0	15
2.1.1.2 Expression von <i>phyC</i> in <i>Nicotiana tabacum</i>	24
2.1.1.2.1 Klonierungsstrategie für <i>phyC</i>	24
2.1.1.2.2 Transformation und Expression von <i>phyC</i>	24
2.1.1.2.2.1 Expressionskontrolle durch transiente Expression von <i>phyC</i>	24
2.1.1.2.2.2 Stabile Integration in das Genom von <i>Nicotiana tabacum</i>	26
2.1.1.3 Expression von <i>phyC<sub>cop</sub></i> aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB45 in <i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Golden Promise	27
2.1.1.3.1 Veränderung der DNA-Sequenz durch Verwendung synonymmer Triplets in Anpassung an die Nutzungshäufigkeit der Triplets durch <i>Hordeum vulgare</i>	27
2.1.1.3.2 Konstruktion des Codon-veränderten <i>phyC</i> -Gens	32

2.1.1.3.3	Fusion von <i>phyC</i> <sub>cop</sub> mit verschiedenen Signalpeptiden und Klonierung in den Vektor p6D35S	32
2.1.1.3.4	Transformation von p6D35S-P <sub>cop</sub> /Chi26/OxOA und Selektion der transgenen <i>Hordeum vulgare</i> Pflanzen	34
2.1.2	Expression des Phytasegens <i>phyK</i> aus <i>Klebsiella pneumoniae</i> ASR1	34
2.1.2.1	Überprüfung der DNA-Sequenz von <i>phyK</i> bezüglich der Codon-Präferenz von <i>Nicotiana tabacum</i> L. und <i>Hordeum vulgare</i> L.	34
2.1.2.2	Expression des Phytasegens <i>phyK</i> in <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Samsun	40
2.1.2.2.1	Klonierungsstrategie für die Expression von <i>phyK</i> in <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Samsun	40
2.1.2.2.2	Transformation und Expressionskontrolle von <i>phyK</i>	41
2.1.2.2.2.1	Expressionskontrolle durch transiente Expression von <i>phyK</i>	41
2.1.2.2.2.2	Stabile Integration von <i>phyK</i> in das Genom von <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Samsun	43
2.1.2.3	Expression von <i>phyK</i> in <i>Hordeum vulgare</i> L. Golden Promise. cv	44
2.1.2.3.1	Klonierungsstrategie für die Expression von <i>phyK</i> in <i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Golden Promise	44
2.1.2.3.2	Transformation von p6D35S-R1 und Selektion der transgenen <i>Hordeum vulgare</i> Pflanzen	45
2.1.3	Nachweis der heterolog exprimierten Proteine in <i>Nicotiana tabacum</i>	45
2.1.3.1	Nachweis von PhyC und PhyK in verschiedenen Geweben von <i>Nicotiana tabacum</i>	45
2.1.3.2	Anteil der rekombinanten Proteine am gesamten löslichen Protein von <i>Nicotiana tabacum</i>	46
2.1.3.3	Phytaseaktivitäten von PhyC und PhyK in den Blättern von <i>Nicotiana tabacum</i>	47
2.1.3.4	Phytaseaktivität im extrazellulären Raum	48
2.1.3.5	Phytaseaktivitäten in den Wurzelexudaten	48
2.1.4	Nachweis von PhyC und PhyK in <i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Golden Promise	49
2.1.4.1	Anteil der rekombinanten Proteine am gesamten löslichen Protein von <i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Golden Promise	51
2.1.4.2	Phytaseaktivitäten von PhyC und PhyK in den Blättern von <i>Hordeum vulgare</i> L.	52
2.1.4.3	Phytaseaktivitäten von PhyC und PhyK im Samenmehl von <i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Golden Promise	53
2.1.4.4	Trockenmasse, Gesamt-Phosphor-Gehalt, Phytinsäuregehalt und Gehalt an anorganischem Phosphor der Samen von <i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Golden Promise mit <i>phyC</i> <sub>cop</sub> und <i>phyK</i>	54

2.1.4.4.1	Trockenmasse der Samen der T <sub>1</sub> -Generation	54
2.1.4.4.2	Anteil von Phytinsäure und anorganischem Phosphor am Gesamtphosphor in den Samen	55
2.1.5	Aufreinigung der heterolog exprimierten Phytasen aus den Wirtsorganismen	59
2.1.5.1	Aufreinigung von PhyC aus verschiedenen Organismen	59
2.1.5.1.1	Aufreinigung aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB45	59
2.1.5.1.2	Aufreinigung von PhyC aus <i>Nicotiana tabacum</i>	60
2.1.5.1.3	Aufreinigung von PhyC aus <i>Hordeum vulgare</i>	61
2.1.5.2	Aufreinigung von PhyK aus verschiedenen Organismen	62
2.1.5.2.1	Aufreinigung von PhyK aus <i>Arxula adeninivorans</i>	62
2.1.5.2.2	Aufreinigung von PhyK aus <i>Nicotiana tabacum</i>	63
2.1.5.2.3	Aufreinigung von PhyK aus <i>Hordeum vulgare</i>	64
2.1.6	Biochemische Charakterisierung der rekombinanten Phytasen	65
2.1.6.1	Nachweis der Glykosylierung	65
2.1.6.1.1	Theoretische Berechnung der N- und O-Glykosylierung	66
2.1.6.1.2	Nachweis durch PAS-Färbung	66
2.1.6.1.3	Nachweis durch Deglykosylierung	67
2.1.6.1.3.1	Transiente Expression von <i>phyC</i> und <i>phyK</i> in <i>Nicotiana tabacum</i> unter Tunicamycineinfluss	67
2.1.6.2	Isoelektrische Fokussierung	68
2.1.6.3	Temperaturoptimum und Thermostabilität von PhyC	69
2.1.6.4	Temperaturoptimum und Thermostabilität von PhyK	71
2.1.6.5	pH-Optimum von PhyC	72
2.1.6.6	pH-Optimum von PhyK	72
2.1.6.7	Kinetische Parameter von PhyC	73
2.1.6.8	Kinetische Parameter von PhyK	74
2.1.7	Wachstumsversuche mit <i>Nicotiana tabacum</i> unter P-Mangelbedingungen	74
2.1.7.1	Vergleich des Wachstums von pMA-P1 und Wildtyp <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Samsun mit Phytat und anorganischem Phosphor als einziger P-Quelle	75
2.1.7.2	Vergleich des Wachstums von pMA-R1 und Wildtyp <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Samsun mit Phytat und anorganischem Phosphor als einziger P-Quelle	76
2.1.8	Wachstumsversuche mit <i>Hordeum vulgare</i>	78
2.1.8.1	Vergleich des Wachstums von <i>phyC</i> <sub>cop</sub> PSP und <i>phyC</i> <sub>cop</sub> OxOA und <i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Golden Promise mit Phytat bzw. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> als einziger P-Quelle	78

2.1.8.2	Vergleich des Wachstums von <i>phyKPSP</i> und Wildtyp <i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Golden Promise mit Phytat bzw. $\text{KH}_2\text{PO}_4$ als einziger P-Quelle	79
<b>3</b>	<b>Diskussion</b>	<b>81</b>
3.1	Heterologe Expression von <i>phyC</i> und <i>phyK</i>	81
3.1.1	Expression in <i>Nicotiana tabacum</i>	81
3.1.2	Expression in <i>Hordeum vulgare</i>	83
3.1.3	Vergleich der rekombinanten PhyC-Proteine mit dem nativen Protein aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	85
3.1.4	Eigenschaften der heterologen PhyK Proteine	88
3.2	Veränderung des Phytatgehalts der Samen	90
3.2.1	Anteil von Phytinsäure und anorganischem Phosphor am Gesamtphosphor der Samen	93
3.3	Wachstumsversuche	97
3.3.1	Wachstumsversuche mit <i>Nicotiana tabacum</i> pMA-P1 und pMA-R1	98
3.3.2	Wachstumsversuche mit <i>Hordeum vulgare phyC<sub>cop</sub>PSP</i> , <i>phyC<sub>cop</sub>OxOA</i> und <i>phyKPSP</i>	100
<b>4</b>	<b>Material</b>	<b>103</b>
4.1	Bakterienstämme	103
4.2	Pflanzenmaterial	103
4.3	Plasmide	104
4.3.1	Plasmide für die Konstruktion der Expressionskassette für <i>Nicotiana tabacum</i>	104
4.3.1.1	pUC18	104
4.3.1.2	pMA	104
4.3.2	Plasmide für die Konstruktion der Expressionskassette für <i>Hordeum vulgare</i>	105
4.3.2.1	UBIp-ABM	105
4.3.2.2	p6D35S	106
4.4	Oligonukleotide	107
4.4.1	Oligonukleotide für die Herstellung eines synthetischen Codon-veränderten <i>phyC</i> -Gens	107
4.4.2	Oligonukleotide als PCR-Primer	108
4.5	Enzyme für gentechnische Arbeiten	110

4.5.1	Restriktionsenzyme	110
4.5.2	DNA-modifizierende Enzyme	111
4.6	Medien, Lösungen, Antibiotika	112
4.6.1	Puffer, Lösungen, Substrate	112
4.7	Geräte	114
<b>5</b>	<b>Methoden</b>	<b>117</b>
5.1	Mikrobiologische Methoden	117
5.1.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	117
5.1.2	Kultivierung von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> pGV2260	117
5.1.3	Kultivierung von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL1	117
5.1.4	Kultivierung von <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB45	117
5.1.5	Kultivierung von <i>Arxula adeninivorans</i>	118
5.2	Kultivierung von Pflanzen	118
5.2.1	Kultivierung von <i>Nicotiana tabacum</i>	118
5.2.1.1	Wachstumsversuche mit <i>Nicotiana tabacum</i>	118
5.2.2	Kultivierung von <i>Hordeum vulgare</i> L. var. Golden promise	120
5.2.2.1	Wachstumsversuche mit <i>Hordeum vulgare</i>	121
5.2.2.1.1	Wachstumsversuch auf Quarzsand	121
5.3	Gentechnische Methoden	122
5.3.1	PCR	122
5.3.1.1	Standard-PCR	122
5.3.1.1.1	Amplifikation des Phytasegens aus dem Ligationsansatz	122
5.3.1.2	SOE-PCR	123
5.3.2	Restriktion	124
5.3.3	Dephosphorylierung	124
5.3.4	Phosphorylierung	124
5.3.4.1	Standard-Phosphorylierung	124
5.3.5	Ligation	125
5.3.5.1	Standard-Ligation	125
5.3.5.2	Ligation von synthetischer genomischer DNA	125
5.3.6	Transformation	125
5.3.6.1	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	125

5.3.6.2	Herstellung kompetenter Zellen von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> pGV2260	126
5.3.6.3	Herstellung kompetenter Zellen von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL1	126
5.3.6.4	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	126
5.3.6.4.1	Transformation von pGV2260	126
5.3.6.4.2	Transformation von AGL1	127
5.3.6.5	Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i>	127
5.3.6.5.1	Stabile Transformation in das Genom	127
5.3.6.5.2	Transiente Expression	127
5.3.6.5.2.1	Transiente Expression unter Tunicamycin-Einfluss	128
5.3.6.6	Transformation von <i>Hordeum vulgare</i>	128
5.3.7	Methoden zur Reinigung und Isolierung von DNA	128
5.3.7.1	Plasmidpräparationen	128
5.3.7.1.1	Miniplasmidpräparation	128
5.3.7.1.2	Spinprep	128
5.3.7.1.3	Midiprep	129
5.3.7.2	Isolierung chromosomaler DNA aus verschiedenen Organismen	129
5.3.7.2.1	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB45 und <i>Klebsiella</i> sp. ASR1	129
5.3.7.2.2	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>Nicotiana tabacum</i>	129
5.3.7.2.3	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>Hordeum vulgare</i>	130
5.3.7.3	Aufreinigung aus Agarose	130
5.3.7.4	Aufreinigung aus wässrigen Lösungen	130
5.3.7.5	Reinigung mit Phenol-Chloroform	130
5.3.7.6	Aufreinigung chromosomaler DNA mit LiCl für Southernblot	131
5.3.8	Southernblot	131
5.3.8.1	Agarose-Gelelektrophorese	131
5.3.8.2	Kapillartransfer	131
5.3.8.3	Herstellung einer mit P <sup>32</sup> radioaktiv markierten Sonde	132
5.3.8.4	Prähybridisierung und Hybridisierung	132
5.3.8.5	Waschen und Entwicklung des Southernblots	132
5.4	Proteinarbeiten	133
5.4.1	Proteinisolierung	133
5.4.1.1	Extraktion von Proteinen aus pflanzlichem Material	133
5.4.1.1.1	Isolierung von Proteinen aus Blattmaterial von <i>Nicotiana tabacum</i> und <i>Hordeum vulgare</i>	133
5.4.1.1.2	Isolierung extrazellulärer Flüssigkeit aus <i>Nicotiana tabacum</i>	133
5.4.1.1.3	Sekretionsversuche mit <i>Nicotiana tabacum</i> und <i>Hordeum vulgare</i>	133



---

5.4.2	Proteinfällung	134
5.4.2.1	Ethanolfällung	134
5.4.2.2	Ammoniumsulfatfällung	134
5.4.2.3	Fällung mit Trichloressigsäure	134
5.4.3	Umpufferung von Proteinproben	135
5.4.3.1	Dialyse	135
5.4.3.2	PD10-Säulen (GE Healthcare)	135
5.4.4	Säulenchromatographie mit Hilfe des LCC500-FPLC-Systems (Pharmacia)	135
5.4.4.1	Ionenaustauschchromatographie	135
5.4.4.1.1	SP-Sepharose	135
5.4.4.1.2	CM-Sepharose	136
5.4.4.2	Gelfiltration	136
5.4.4.2.1	Präparative Gelfiltration mit Superdex 75 (Pharmacia)	136
5.4.4.3	Affinitätschromatographie	137
5.4.4.3.1	Reinigung polyklonaler Antikörper mittels Hi-Trap Protein G-HP- Säule (GE-Healthcare)	137
5.4.4.3.2	Hitrap™ NHS-aktivierte HP Säulen	137
5.4.5	Proteinelektrophorese	138
5.4.5.1	Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese	138
5.4.5.2	Nachweis von Proteinen im Polyacrylamidgel	139
5.4.5.2.1	Coomassiefärbung	139
5.4.5.3	Silberfärbung	139
5.4.5.4	Färbung von Glykoproteinen	140
5.4.5.5	Westernblot-Analyse	141
5.4.6	Biochemische Charakterisierung	142
5.4.6.1	Phytaseaktivitätstest	142
5.4.6.2	Probenaufbereitung für den Phytaseaktivitätstest aus Blattmaterial	143
5.4.6.3	Probenaufbereitung für den Phytaseaktivitätstest aus Samenmehl	143
5.4.6.4	Temperaturoptimum und Temperaturstabilität	144
5.4.6.5	pH-Optimum und pH-Stabilität	144
5.4.6.6	Kinetische Parameter	144
5.4.6.7	Proteinbestimmung nach Bradford	145
5.4.7	Bodenanalyse	145
5.4.7.1	Herstellung des Bodens (Zusammensetzung)	145
5.4.7.2	pH-Wert Bestimmung	145
5.4.7.3	Bestimmung des pflanzenverfügbaren P-Gehalts des Bodens mit der CAL-Methode	146

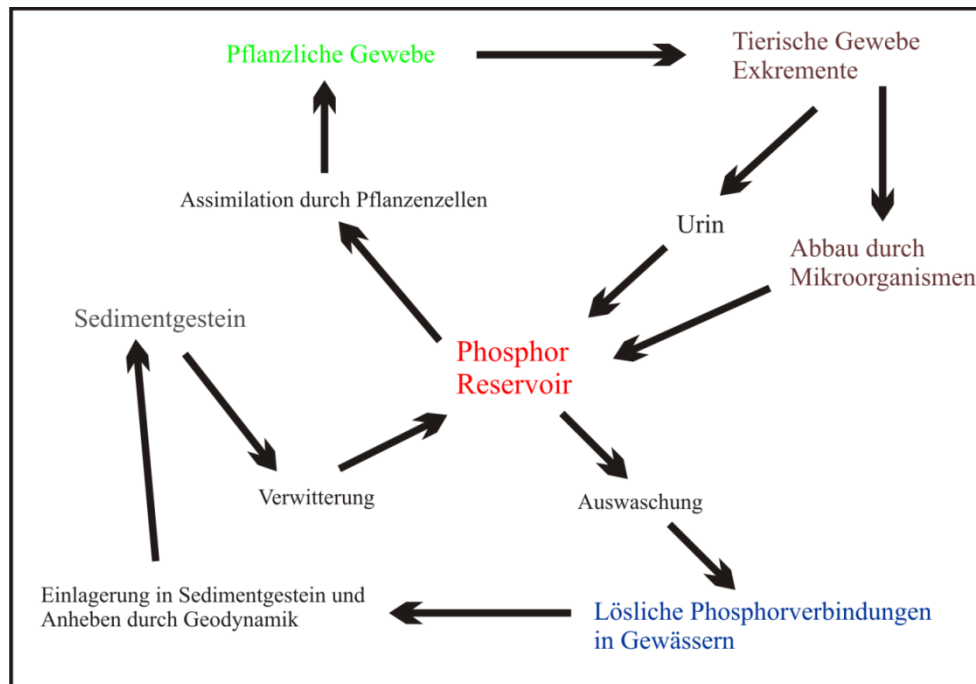
5.4.7.4	Bestimmung der Wasserhaltekapazität des Bodens	146
5.4.8	Pflanzenanalyse	146
5.4.8.1	Statistik	146
5.4.8.2	Frischmasse	146
5.4.8.3	Trockenmasse	147
5.4.8.4	Bestimmung des Gesamt-P-Gehalts im Sproß	147
5.4.8.5	Bestimmung des Gesamt-P-Gehalts in Samen	147
5.4.8.6	Bestimmung des Phytatgehalts in Samen durch HPIC-Analyse	147
5.4.8.6.1	Extraktion der Inositolphosphate aus Samen	147
5.4.8.6.2	HPIC-Analyse	148
5.4.8.7	Wurzelmorphologie	148
5.4.8.7.1	Spezifische Wurzellänge	149
5.4.8.7.2	Gesamtwurzellänge	149
5.4.8.7.3	Durchschnittlicher Wurzeldurchmesser	149
5.5	Software	149
<b>6</b>	<b>Referenzen</b>	<b>151</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>165</b>
7.1	Miniplasmidpräparation	165
7.2	Lösungen für die Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i>	165
7.3	Programm der HPIC-Analysen	166
7.4	Kalibrierung der HPIC	168
	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>169</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>171</b>
	<b>Selbständigkeitserklärung</b>	<b>173</b>

# 1 Einleitung

Phosphate bzw. Phosphorsäureester sind Verbindungen von zentraler Bedeutung für das Leben. Sie sind an vielen biologischen Prozessen beteiligt und ihre Disponibilität ist für alle Lebewesen essentiell. Phosphor liegt in der Natur hauptsächlich in gebundener Form vor. Er ist beteiligt am Aufbau der DNA/RNA und Bestandteil an einem der wichtigsten Trägermoleküle des Energiestoffwechsels, dem ATP. Weiterhin ist er in Coenzymen, Phospholipiden und Zuckerphosphaten enthalten. Eine der wichtigsten Arten von biochemischen Reaktionen im Stoffwechsel der Organismen stellen Phosphorylierungsreaktionen dar. Da viele Phosphorverbindungen nur schwer zugänglich sind, ist die Limitation von frei verfügbarem Phosphor ein Hauptproblem in der Ernährung für alle Organismen in der Natur. Das Problem der Phosphorverfügbarkeit und der Mobilisierung der Phosphorressourcen ist schon seit langem bekannt und aus ökonomischen und ökologischen Gründen Gegenstand der Forschung.

## 1.1 Der natürliche Phosphorkreislauf

Der Phosphorzyklus unterscheidet sich von anderen biogeochemischen Kreisläufen dadurch, dass er keine Gasphase einschließt. Wasser, Kohlenstoff, Stickstoff und der Schwefelzyklus beinhalten alle eine Phase in der sich das Element in einem gasförmigen Zustand befindet. Phosphor zirkuliert aufgrund der Temperaturen und Druckverhältnisse der Erde kaum in der Atmosphäre. Das größte Reservoir an Phosphor befindet sich in den Sedimentgesteins-Schichten. Dort beginnt auch der natürliche Phosphorkreislauf (Abbildung 1). Durch Regen und Erosion wird der Phosphor als Phosphatverbindungen aus dem Gestein ausgewaschen und auf Boden und Wasser verteilt. Pflanzen und Mikroorganismen nehmen die Phosphat-Ionen aus der Bodenlösung auf. Pflanzen geben diese an Tiere, Menschen und Mikroorganismen weiter. Die Phosphorverbindungen werden in tierischen bzw. pflanzlichen Geweben gespeichert und ein Teil wird durch Exkremente dem Boden wieder zugeführt. Nach Absterben der Organismen werden diese durch Mikroorganismen abgebaut und danach dem Boden wieder zugeführt.



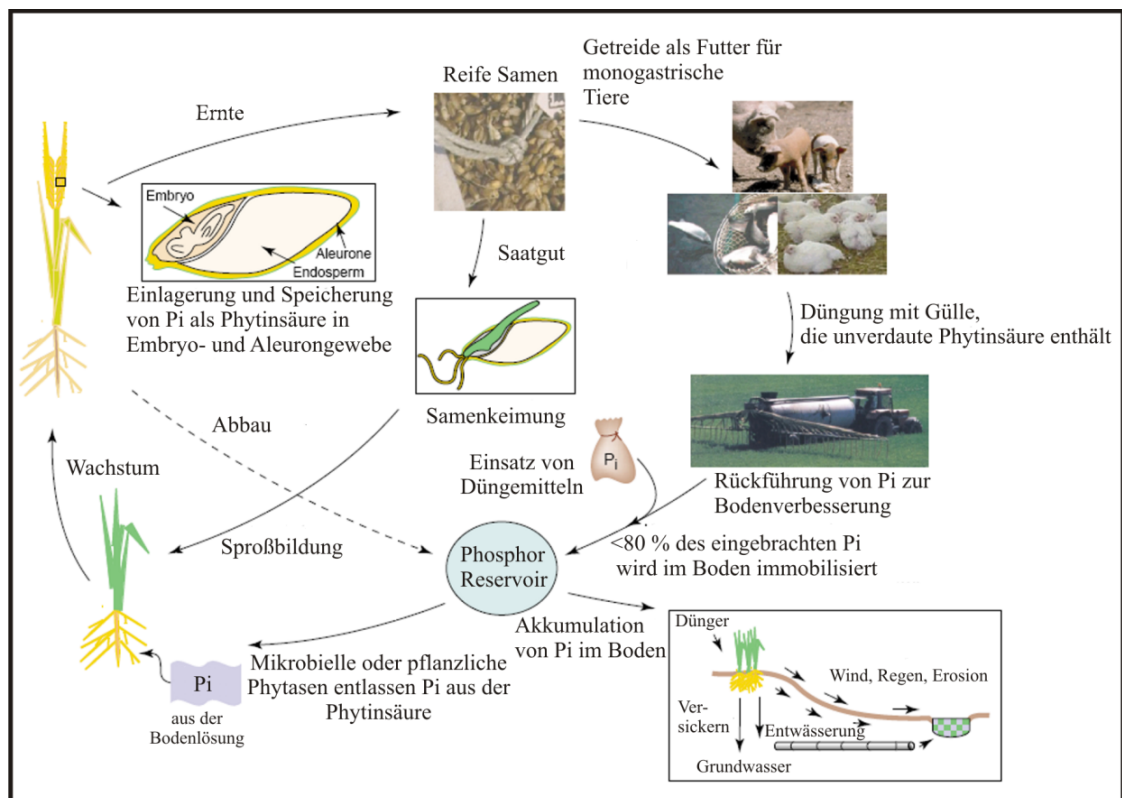
**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des natürlichen Phosphorkreislaufs.

Der gleiche Prozess findet im aquatischen Ökosystem statt. Da Phosphor schlecht löslich ist und er fest an die Moleküle des Bodens gebunden ist, erreicht er auf natürlichem Wege das Wasser durch die Wanderung mit Bodenpartikeln bzw. löst sich aus dem Sedimentgestein auf dem Boden von Gewässern. Die Phosphorverbindungen tendieren in der Regel dazu, sich an den Böden der Gewässer abzusetzen. Sie werden dort von Wasserpflanzen und Mikroorganismen aufgenommen und der aquatischen Nahrungskette zur Verfügung gestellt. Durch geologische Kräfte wird das Sedimentgestein angehoben und der Phosphor kann so von den Landlebewesen aufgenommen werden.

## 1.2 Der Phosphorkreislauf in landwirtschaftlich genutzten Ökosystemen

Der Einsatz von phosphorhaltigen Düngemitteln, wie z.B. Guano oder Superphosphat führte seit Mitte des 19. Jahrhunderts zur Steigerung der Ernteerträge pro Hektar um ein Vielfaches. Auch Exkremente aus der Massentierhaltung wurden verstärkt als Düngemittel auf die landwirtschaftlichen Böden aufgebracht. Durch diesen Eingriff des Menschen in den natürlichen Kreislauf, gelangten Phosphorverbindungen aus Düngemitteln, industriellem Müll und Abwässern in das Ökosystem (Abbildung 2). Seit 1960 hatte sich der Einsatz von phosphorhaltigen Düngemitteln aufgrund des Anstiegs der Weltbevölkerung von 9 Millionen Tonnen auf 40 Millionen Tonnen vervierfacht bis verfünffacht. So werden die billigen und gut abbaubaren Phosphorvorkommen voraussichtlich in 60 bis 80 Jahren weltweit erschöpft sein (Vance 2001). Eine intensive Phosphorzugabe ist problematisch, da in Abhän-

gigkeit vom jeweiligen Boden ein großer Teil des Phosphors immobilisiert wird und damit nicht mehr verfügbar ist. Aufgrund dessen werden nur bis zu 20 % oder weniger durch die Kulturpflanzen aufgenommen und so dem Boden wieder entzogen (Carroll, Claudia et al. 2003). Dies führt zu einer Belastung des Bodens mit Phosphor und durch Auswaschung und Erosion zu einer Eutrophierung und Hypoxie von Gewässern (Runge-Metzger 1995; Bumb and Baanante 1996).



**Abbildung 2:** Phosphorkreislauf in landwirtschaftlich genutzten Ökosystemen. Die Abbildung aus (Brinch-Pedersen, Sorensen et al. 2002) ist modifiziert worden.

### 1.3 Phosphor im Boden und seine Verfügbarkeit für Pflanzen

Phosphor ist eines von 17 essentiellen Elementen, die für das Pflanzenwachstum benötigt werden (Raghothama 1999). Er wird aufgrund seiner Konzentration in der Trockenmasse der Pflanze zu den Makroelementen gezählt. Die Konzentration in den Pflanzen schwankt zwischen 0,05 und 0,50 % der Trockenmasse, das entspricht ca. einer Konzentration von 2-20 mM in den Pflanzengewebe (Bielecki 1973; Schachtman, Reid et al. 1998; Raghothama 1999). Selbst in fruchtbaren Böden liegt die Konzentration an frei verfügbarem Phosphor für die Pflanze unter 10  $\mu$ M (Bielecki 1973; Schachtman, Reid et al. 1998). In den meisten Böden beträgt sie nicht mehr als 2  $\mu$ M (Raghothama 1999). Damit ist Phosphor einer der am schlechtesten verfügbaren Nährstoffe im Boden. Seine Konzentration ist gewöhnlich niedriger als die vieler Mikroelemente (Barber and Silverbush 1984).

Die mangelhafte Verfügbarkeit von Phosphor limitiert auf über 30 % der weltweit nutzbaren Ackerflächen die Ernteerträge (Carroll, Claudia et al. 2003).

Im Boden liegt Phosphor in anorganischen und organischen Verbindungen vor. Die anorganischen Verbindungen werden in drei Fraktionen eingeteilt.

- Die erste ist der Anteil an ungebundenem Phosphor, meist in Form von Phosphationen, in der Bodenlösung. Sie ist labil und direkt pflanzenverfügbar, aber mit 1 bis 2 kg/ha die kleinste Fraktion.

- Die zweite Fraktion ist die anorganische, in der der Phosphor mit Aluminium, Eisen oder Kalziumionen assoziiert vorliegt. Diese Verbindungen variieren in ihrer Löslichkeit und Verfügbarkeit für die Pflanze. Dabei spielen der pH des Bodens und die Konzentration der jeweiligen Kationen eine große Rolle. So führt in sauren Böden eine Adsorption des Phosphors an Kationen, wie Eisen oder Aluminium, zu seiner Fixierung. In basischen Böden kommt es zu einer Ausfällung mit Kalzium (Carroll, Claudia et al. 2003). Der Anteil der labilen anorganischen Fraktion ist mit 450 bis 900 kg/ ha der Zweitgrößte.

- Den Hauptanteil des anorganischen Phosphorreservoirs stellt die stabile Fraktion. Sie beträgt 3000 bis 6000 kg/ ha und ist für Pflanzen nicht verfügbar. Sie besteht unter anderem aus Kalziumphosphaten und Apatiten. Der organische Phosphoranteil in gedüngten Böden schwankt zwischen 50 und 80 % des Gesamtphosphors (Dalal 1977; McLaughlin, Baker et al. 1990) Inositolpenta- und hexaphosphate und ihre Derivate zählen zu den Hauptformen des organischen Phosphors im Boden (Anderson 1980). Ihr Gehalt schwankt z.B. zwischen 0,4 und 38 % des organischen Phosphors in australischen Böden (Williams and Anderson 1968) und zwischen 24 und 58 % in britischen Böden (Richardson, Hadobas et al. 2001).

Um für Pflanzen verfügbar zu sein, müssen organische Phosphorverbindungen als erstes durch Phosphatasen hydrolysiert werden, um den anorganischen Phosphor (Pi) freizusetzen. In Böden wird dies vor allem durch Bodenmikroorganismen gewährleistet, da Pflanzen nur eine beschränkte Fähigkeit besitzen diese zu nutzen (Hayes, Simpson et al. 2000).

### **1.4 Akquisitionsstrategien und Anpassungen der Pflanzen an Phosphormangel**

Pflanzen haben Strategien entwickelt, um die vorhandenen Phosphorressourcen für sich bestmöglich zu nutzen. Dabei unterscheidet man zwei grundsätzliche Taktiken für die

Phosphoraufnahme unter Mangelbedingungen. Zum einen die maximale Ausnutzung und Konservierung des verfügbaren Phosphors und zum anderen die verbesserte Akquisition und Aufnahme des Phosphors aus der Umwelt (Vance 2001).

- Die erste Strategie schließt geringere Wachstumsraten, erhöhtes Wachstum pro aufgenommene Phosphormenge, Remobilisierung vorhandener interner Phosphorressourcen, Veränderungen im Kohlenstoffstoffwechsel durch Umgehen von Reaktionen, die *ortho*-Phosphat (Pi) benötigen und Durchführung von alternativen respiratorischen Wegen ein (Schachtman, Reid et al. 1998; Plaxton and Carswell 1999; Raghothama 1999; Uhde-Stone, Gilbert et al. 2003; Uhde-Stone, Zinn et al. 2003).
- Die andere Taktik die Phosphoraufnahme zu erhöhen, führt zu verstärkter Produktion und Sekretion von Phosphatasen, der Ausscheidung von organischen Säuren, stärkerem Wurzelwachstum, verbunden mit modifizierter Wurzelarchitektur, Vergrößerung der Wurzeloberfläche, vermehrter Wurzelhaarbildung und gesteigerter Expression von Pi-Transportern (Marschner, Römheld et al. 1986; Duff, Sarath et al. 1994; Schachtman, Reid et al. 1998; Raghothama 1999; Gilroy and Jones 2000; Lynch and Brown 2001).

#### 1.4.1 Phosphoraufnahme durch die Pflanze

Phosphor wird durch die Pflanze über die Wurzel aus der Bodenlösung in Form von *ortho*-Phosphaten  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  und  $\text{HPO}_4^{2-}$  aufgenommen. Diese liegen in sehr geringen Konzentrationen von nur 0,1 bis 10  $\mu\text{M}$  vor (Hinsinger 2001). Das pH-Optimum für die Aufnahme von Pi liegt bei 4,5 bis 5,0. Dies zeigt, dass die Pflanzen die Form von  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  gegenüber der von  $\text{HPO}_4^{2-}$  bevorzugen (Raghothama 1999). Die niedrige Konzentration an Pi (weniger als 2  $\mu\text{M}$ ) in der Bodenlösung neben der in der Pflanzenzelle (2-20mM) sowie das negative Membranpotential bedingen, dass ein aktiver Transport über die Plasmalemma erforderlich ist. Inhibitorstudien haben gezeigt, dass die Aufnahme unter Energieaufwendung erfolgen muss (Bielecki 1973; Raghothama 1999).

Pflanzen haben zwei Aufnahmesysteme für Pi, ein niedrig- und ein hoch affines (Bielecki 1973; Smith, Rae et al. 2000).

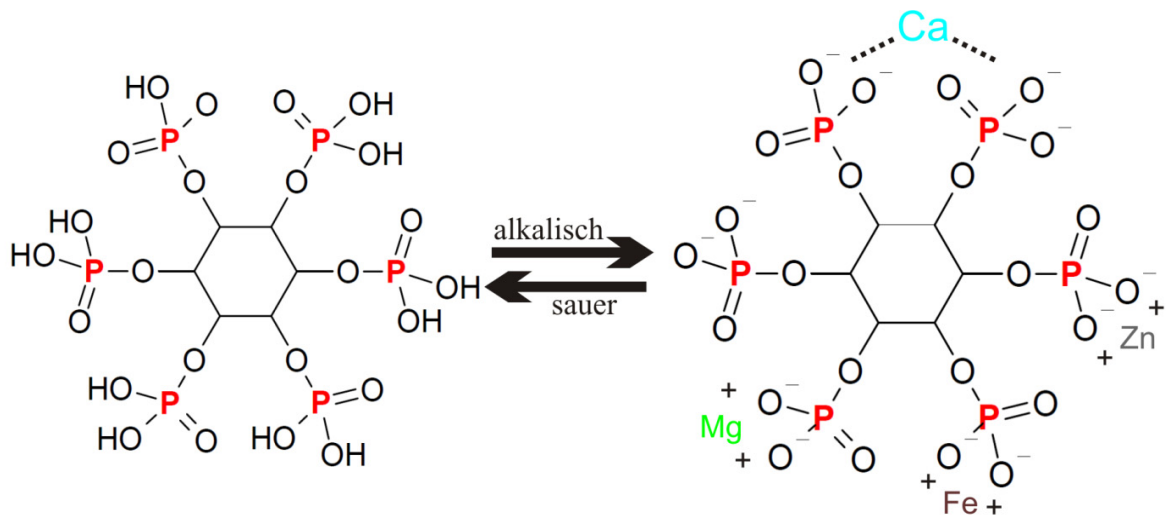
Das Aufnahmesystem mit dem hohen  $K_m$ -Wert für  $P_i$  zwischen 50 und 300  $\mu M$  (Nandi, Pant et al. 1987; Furihata, Suzuki et al. 1992) liegt in den Pflanzen konstitutiv vor (Raghothama 1999).

Das hochaffine System hat einen  $K_m$ -Wert von 1-10  $\mu M$  (Furihata, Suzuki et al. 1992; Raghothama 2000) und wird durch Phosphormangel induziert (Raghothama 1999). Nach Aufnahme über die Plasmalemma bewegt sich der Phosphor symplastisch von der Wurzeloberfläche zum Xylem mit einer Geschwindigkeit von 2 mm/h (Bieleski 1973). Der Transport zu den oberirdischen Teilen der Pflanze erfolgt mit dem Xylemfluß und weiter durch symplastischen Transport innerhalb der Gewebe zu den Zellen. Der Transport vom Xylem zum Zytoplasma und vom Zytoplasma in die Vakuole findet gegen einen steilen elektrochemischen Gradienten statt und erfordert deshalb Energieaufwendungen (Ullrich and Novacky 1990; Raghothama 2000).

### 1.5 Die Phytinsäure

Da die Akquisition und die Aufnahme von Phosphor durch die Pflanze in höchstem Maße energieaufwendig sind, haben Pflanzen die Fähigkeit entwickelt Phosphor in Form von Phytinssäure zu speichern. Die Konservierung der Phosphorreserven als Phytinsäure ist eine Möglichkeit sich die vorhandenen Ressourcen zu sichern und an die Nachkommen weiterzugeben. Die Phytinsäure ist die Hauptspeicherform von Phosphor in den Samen (Cosgrove 1980). Ihr Anteil am Gesamtphosphor beträgt dort 50-80 % (Lott 1984; Raboy 1997). Sie bzw. ihr Anion Phytat ist in Abhängigkeit vom pH-Wert, mit ein bzw. zweiwertigen Kationen, wie  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  komplexiert (Abbildung 3). Im sauren pH-Bereich sind die Phosphatgruppen des Phytats protoniert und es existiert vorwiegend die metallfreie Form. Bei neutralen pH-Werten steigt durch die Deprotonierung der Phosphatgruppen die Affinität zu bivalenten Kationen, wie  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  und  $Cu^{2+}$  und es wird das Metall-Phytat gebildet (Maenz, Engele-Schaan et al. 1999; Bohn, Josefsen et al. 2007). Die Art der Komplexbildung ist abhängig vom Ionenradius. Größere Ionen, wie  $Ca^{2+}$ , binden an zwei Phosphatgruppen und Ionen mit einem kleinen Ionenradius, ( $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ) binden nur an einem Phosphatrest (Cheryan 1980; Martin and Evans 1986).





**Abbildung 3:** Verhalten der Phytinsäure in Abhängigkeit vom pH-Wert der Umgebung.

Die gemischten Phytate sind in monokotylen Pflanzen im Embryo und in den Aleuronschichten konzentriert. In dikotylen Pflanzen im Endosperm und in den Keimblättern (O'Dell, De Boland et al. 1972). Die Phytinsäure, chemisch *D-myoinositol*-(1,2,3,4,5,6)-hexakisphosphat ( $\text{IP}_6$ ), existiert in der Natur hauptsächlich in der *myo*-Form da, diese Sesselform am thermostabilsten ist (Lung and Lim 2005). Sie besteht aus einem *D-myoinositol*ring an den sechs Phosphatreste über Esterbindungen an die Kohlenstoffatome gebunden sind. Sie ist stabil und sehr beständig gegenüber chemischer und enzymatischer Degradation. Die Synthese von Phytinsäure erfolgt, vom *myo*-Inositol ausgehend, über mehrere Phosphorylierungsschritte. *Myo*-Inositol ist das zyklische Alkoholderivat der Glukose (Loewus and Murthy 2000). Sie ist Bestandteil zahlreicher Stoffwechselwege in Pflanzenzellen wie der Indoleessigsäure-Metabolismus, die Zellwand-Polysaccharid-Synthese, die Synthese zyklischer Alkohole und der Phosphatidylinositol/ Inositolphosphat-Weg (Raboy 2003). *Myo*-Inositol und seine Phosphorsäureester liegen ubiquitär in eukaryotischen Zellen vor. Dabei ist *myo*-Inositolhexakisphosphat die am häufigsten vorkommende Form (Raboy 2003).

In Pflanzen ist die Phytinsäure außer in Samen auch in anderen Pflanzengewebe und -organen, wie Pollen, Wurzeln und Knollen zu finden (Lott 1995). Sie liegt in Globoid-Kristallen vor, welche zusammen mit Proteinen in Vesikeln gelagert sind (Lott 1984). Die Phytinsäure ist nur durch spezielle Enzyme, die Phytasen vollständig abbaubar. Während der Keimung werden zur Ernährung des heranwachsenden Keimlings die Phytinsäurekomplexe durch endogene Phytasen gespalten und neben  $\text{Pi}$  und *myo*-Inositol werden die komplexierten Kationen freigesetzt. Der Vorrat an Phosphor und Mineralien

hilft dem Keimling die Zeit bis zur vollständigen Ausbildung der Wurzel, die die selbständige Aufnahme von Nährstoffen ermöglicht, zu überbrücken.

### 1.5.1 Phytasen

Phytasen sind in der Natur weit verbreitet. Sie sind in Tieren, in Pflanzen und Mikroorganismen zu finden (Dvorakova 1998; Liu, Rafiq et al. 1998). Phytatspaltende Enzyme sind z.B. im Blutplasma und in Erythrozyten von Vögeln, Reptilien und Fischen (Rapoport, Leva et al. 1941) gefunden worden. In Pflanzen hat man Phytasen z.B. in Wurzeln in Getreidesamen (Li, Osaki et al. 1997; Lung, Leung et al. 2008) (Hamada 1996; Maugenest, Martinez et al. 1999; Greiner, Jany et al. 2000; Greiner and Egli 2003) und Pollen (Scott and Loewus 1986; Barrientos, Scott et al. 1994; Jog, Garchow et al. 2005) nachgewiesen. In Pilzen der Gattungen *Aspergillus* (Shieh and Ware 1968; Volfova, Dvorakova et al. 1994; Bogar, Szakacs et al. 2003; Martin, Murphy et al. 2006), *Mucor* (Bogar, Szakacs et al. 2003) und *Rhizopus* (Bogar, Szakacs et al. 2003) und in Hefen (Sano, Fukuhara et al. 1999) wurden weitere Phytasen entdeckt. Für grampositive Bakterien wie *Bacillus amyloliquefaciens* (Kim, Lee et al. 1998; Igbasan, Manner et al. 2000; Idriss, Makarewicz et al. 2002) und *Bacillus subtilis* (Powar and Jagannathan 1967; Kerovuo, Lauraeus et al. 1998) sowie für gramnegative Bakterien wie *E.coli* (Golovan, Wang et al. 2000; Miksch, Kleist et al. 2002) *Citrobacter* (Kim, Kim et al. 2003) und *Klebsiella* sp. (Shah and Parekh 1990; Greiner, Haller et al. 1997; Sajidan, Farouk et al. 2004) wurden ebenfalls phytatspaltende Enzyme dokumentiert.

Die Phytasen, biochemisch *myo*-Inositolhexakisphosphat-Phosphohydrolasen werden nach der NC-IUBMB-Nomenklatur in die große Gruppe der Phosphatasen (E.C. 3) eingeordnet. Da sie die Hydrolyse von *myo*-Inositolhexakisphosphat zu *ortho*-Phosphat und zu niedrigeren Phosphorestern des *myo*-Inositols katalysieren, werden sie zu den Phosphomonoester-Hydrolasen (E.C.3.1.3) gezählt. Die weitere Unterteilung der Phosphomonoester-Hydrolasen erfolgt nach ihren biochemischen Eigenschaften wie z.B. ihrer Substratspezifität und ihrem pH-Optimum in:

- Alkalische Phosphatasen (E.C. 3.1.3.1)
- Saure Phosphatasen (E.C. 3.1.3.2)
- Phytasen (E.C. 3.1.3.8/26/72) und
- andere Enzyme (E.C. 3.1.3.X), die spezielle Phosphoresterverbindungen hydrolysieren können.

Zurzeit unterteilt man die Phytasen in Abhängigkeit davon, von welchem Kohlenstoffatom des *myo*-Inositolrings der Phosphatrest zuerst abgespalten wird. Dabei unterscheidet die *IUPAC-IUB* zwischen 3-Phytasen (E.C. 3.1.3.8), 4-Phytasen (E.C. 3.1.3.26) und 5-Phytasen (E.C. 3.1.3.72). Innerhalb dieser Gruppen unterteilt man noch aufgrund ihres pH-Optimums nach sauren oder alkalischen Phytasen. Zur Gruppe der 3-Phytasen gehören die meisten der heute bekannten pilzlichen und bakteriellen Phytasen. Sie werden durch Pilze und grampositive Bakterien größtenteils sekretiert bzw. sind periplasmatische Enzyme der gramnegativen Bakterien. Sie beinhalten sowohl saure als auch alkalische Phytasen. Die meisten Phytasen in Pflanzen werden den 4-Phytasen zugeordnet. Für die 5-Phytasen in Pflanzen wurde z. Zt. nur die alkalische Phytase aus *Lilium longiflorum* charakterisiert (Jog, Garchow et al. 2005).

Innerhalb der Kategorien der 3-, 4- und 5-Phytasen gibt es Gruppen die sich sowohl in ihrer Struktur, ihren biochemischen Eigenschaften als auch in ihren Phytat-Abbauwegen unterscheiden. In Bezug auf die Struktur ist es möglich verschiedene Gruppen von Phytasen voneinander abzugrenzen. Eigenständige Gruppen bilden hierbei die  $\beta$ -Propeller Phytasen, die sauren Histidin-Phosphatasen, die sauren Purpur-Phosphatasen (Mullaney and Ullah 2003), die Protein-Tyrosine-Phosphatasen (Puhl, Gruninger et al. 2007) und eine *myo*-Inositolpolyphosphatase aus *Selenomonas* (Yanke, Bae et al. 1998; Chu, Guo et al. 2004).

#### **1.5.1.1 Die $\beta$ -Propeller Phytase aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45**

Die  $\beta$ -Propeller-Phytasen bilden innerhalb der 3-Phytasen eine eigene Gruppe. Sie sind kalziumabhängig, thermostabil und hydrolysieren ihr Substrat im neutralen bis alkalischen Milieu. Die Struktur dieser Phytasen ähnelt der eines Propellers mit 6 Flügeln, der jeweils aus vier bzw. fünf antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern aufgebaut ist. Die Flügel sind um eine Pseudo-Symmetrieachse angeordnet, die durch den Schaft des Propellers verläuft. Der Schaft bildet einen Kanal, der mit vielen geordneten Wassermolekülen gefüllt ist (Ha, Oh et al. 2000; Shin, Ha et al. 2001). Das aktive Zentrum liegt in der einzigen von der Struktur ausgebildeten Vertiefung, in der sich die Kalzium-Ionen der Dreiergruppe Ca3-Ca6 befinden (Shin, Ha et al. 2001). Es ist in der Lage zwei Phosphat-Ionen gleichzeitig zu binden. Es werden insgesamt sechs bis sieben Kalzium-Ionen im Molekül gebunden. Dabei bewirken die drei hoch affinen Bindungsstellen, Ca1-Ca3, die Thermostabilität und die weiteren Bindungsstellen Ca4-Ca6 sind für die katalytische Aktivität verantwortlich (Ha, Oh et al. 2000; Kerovuo, Rouvinen et al. 2000). Die  $\beta$ -Propeller-Phytasen vermögen das Phytat bis zum *myo*-Inositoltriphosphat abzubauen. Nach Abspaltung des Phosphatrestes am C3-

Atom und Entstehung von D-myo-Ins(1,2,4,5,6)P5 werden noch zwei weitere Reste alternierend am C1-Atom (*myo*-Ins(2,4,5,6)P4) und am C5-Atom des *myo*-Inositolrings hydrolysiert. Das Endprodukt ist *myo*-Ins(2,4,6)P3 (Oh, Kim et al. 2006; Greiner, Lim et al. 2007).

Die Phytase von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 ist mit der strukturell untersuchten  $\beta$ -Propeller-Phytase von *Bacillus amyloliquefaciens* DS11 (Oh, Chang et al. 2001; Oh, Kim et al. 2006) zu 98 % in der Aminosäuresequenz identisch. Die 3-Phytase von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 ist thermostabiler als die Phytasen aus *Bacillus subtilis* (Kerovuo, Lauraeus et al. 1998) und *Bacillus amyloliquefaciens* DS11 und hat ihr Temperaturoptimum um 70°C. Sie wird wie die anderen *Bacillus* Phytasen durch Cadmium und Molybdat gehemmt. Ihr Optimum liegt bei pH 7.0. Die Phytase hydrolysiert nicht die üblichen Phosphatasesubstrate *para*-Nitrophenylphosphat, 1-Naphtylphosphat und 2-Naphtylphosphat. Sie ist resistent gegen den proteolytischen Abbau durch Pankreatin aber sensibel gegenüber Pepsin (Igbasan, Manner et al. 2000).

### 1.5.1.2 Die saure Histidin-Phosphatase aus *Klebsiella* sp. ASR1

Die meisten bekannten Phytasen gehören zu den sauren Histidin-Phosphatasen (HAP) (Mullaney and Ullah 2003). Der Gruppe der HAPs ordnet man sowohl Vertreter von 3- als auch 4-Phytasen zu. Alle Mitglieder dieser Klasse besitzen im aktiven Zentrum konservierte Aminosäure-Motive zum einen das Hepta-Peptid-Motiv RHGXRXP und zum anderen das HD-Motiv (Ullah, Cummins et al. 1991). Die Spaltung des Substrats erfolgt am katalytisch aktiven Histidinrest. Wie der Name der HAPs andeutet, erfolgt die Hydrolyse des Phytats durch die Phytasen dieser Gruppe unter sauren Bedingungen. Das bedeutet, dass nur die metallfreie Form des Phytats hydrolysiert werden kann. Zu den HAPs zählen sowohl pilzliche, pflanzliche als auch bakterielle Phytasen (Dvorakova 1998; Mullaney and Ullah 2003; Haefner, Knietsch et al. 2005). Da die Phytasen der HAP-Gruppe aus einem großen Spektrum mit verschiedensten Organismen entstammen, variieren auch ihre Eigenschaften in Bezug auf Temperaturoptima und Substratspezifität. Einige zeigen ein breites Substratspektrum und sind in der Lage neben Phytat auch aus anderen Phosphoresterverbindungen *ortho*-Phosphat abzuspalten (Wyss, Brugger et al. 1999). Andere sind sehr spezifisch für Phytat und können andere Substrate nur schlecht umsetzen (Wyss, Brugger et al. 1999).

Die Phytase aus *Klebsiella* sp. ASR1 gehört zu den 3-Phytasen. Sie vermag neben Phytat auch andere Phosphorester, wie NADP, *para*-Nitrophenylphosphat und Zuckerphosphate zu hydrolysieren (Sajidan, Farouk et al. 2004). Strukturell gehört sie zu den HAPs und weist eine hohe Ähnlichkeit zur AppA aus *E. coli* mit 40,5 % ähnlichen Aminosäuren auf (Sajidan, Farouk et al. 2004). Sie hat ihr Optimum bei pH 5,0 und ist inaktiv bei pH-Werten unter 4,0 und über 7,0. Die Phytase aus *Klebsiella* sp ASR1 ist im Gegensatz zu den  $\beta$ -Propeller-Phytasen nicht so thermostabil und hat ihr Temperaturoptimum um 50 °C (Sajidan, Farouk et al. 2004; Herter 2009).

## 1.6 Heterologe Genexpression

In den 70er und 80er Jahren des 20sten Jahrhunderts wurde eine Vielzahl von DNA-Arbeitstechniken und Technologien des Gentransfers entwickelt. Diese haben die Möglichkeit eröffnet, heterologe Gene in Wirtsorganismen zu exprimieren. Der Bestand an verfügbaren Expressionssystemen beinhaltet prokaryotische und eukaryotische Systeme. Bei den prokaryotischen Systemen ist das gramnegative Enterobakterium *Escherichia coli* einer der am häufigsten in der Forschung genutzten Wirte zur Expression von Fremdgenen (Shatzman and Rosenberg 1986; Chao, Law et al. 2002; Tenger, Khoroshyy et al. 2007; He, Feng et al. 2008).

Bei den grampositiven Bakterien sind Vertreter der *Bacillaceae*, wie *Bacillus subtilis* (Thornewell, East et al. 1993; Baillie, Moore et al. 1998; Brockmeier, Wendorff et al. 2006) und *B. megaterium* (Rygus and Hillen 1991; Burger, Tatge et al. 2003; Malten, Biedendieck et al. 2006; Gamer, Frode et al. 2009) zur Produktion rekombinanter Proteine geeignet. Vorteile der prokaryotischen Expressionssysteme sind ihre gut untersuchte Physiologie, die kurzen Generationszeiten und ihre einfache Handhabung. Nachteile dieser Expressionssysteme sind die Bildung von Einschlußkörperchen (inclusion bodies) z.B. bei *E. coli* (Williams, Van Frank et al. 1982; Petrov, Jay et al. 1987) und bei der Expression von eukaryotischen Genen das Fehlen der posttranslationalen Proteinmodifikation, wie Glykosylierungen.

In Eukaryoten ist die Expression von rekombinanten Proteinen in Hefen wie *Pichia pastoris* (Kocken and Thomas 1996; Austin, Jones et al. 1998; Zhang, Luo et al. 2009) und *Saccharomyces cerevisiae* (Purvis, Chotai et al. 1991; Choi, Sohn et al. 1994; Geymonat, Spanos et al. 2007), filamentösen Pilzen wie *Aspergillus niger* (Turnbull, Smith et al. 1990; Roberts, Jeenes et al. 1992; Roth and Dersch 2009) und *Aspergillus oryzae* (Yaver, Lamsa

et al. 2000; Nemoto, Maruyama et al. 2009), Insektenzellen (Miyamoto, Smith et al. 1985; Srinivasan and Thompson 1990; Chimoy Effio, Folgueras-Flatschart et al. 2003), Säugerkzellen (Kim, Oh et al. 1997; Chen, Gray et al. 2001; Florin, Pegel et al. 2009) und transgenen Pflanzen (Berna and Bernier 1997; de Peyer, Wetten et al. 1999; Outchkourov, Rogelj et al. 2003; Plesha, Huang et al. 2009) erfolgt.

Phytasen wurden bisher sowohl in *E. coli*- und *Bacillus*-Expressionssystemen (Kerovuo, Lauraeus et al. 1998; Kim, Lee et al. 1998; Yao, Yuan et al. 2001; Idriss, Makarewicz et al. 2002; Sajidan, Farouk et al. 2004; Rao, Rao et al. 2008), als auch in Hefen (Rodriguez, Mullaney et al. 2000; Hahn, Tag et al. 2006), Säugern (Golovan, Hayes et al. 2001; Golovan, Meidinger et al. 2001) und Pflanzen (Verwoerd, van Paridon et al. 1995; Coello, Maughan et al. 2001; Richardson, Hadobas et al. 2001; Zhang, An et al. 2005) exprimiert.

### 1.6.1 Transgene Pflanzen

Die genetische Veränderung von Pflanzen durch Einführung von Fremdgenen ist heute eine der routinemäßigen Anwendungen der Gentechnik. Durch die Entdeckung der Möglichkeit des DNA-Transfers mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* (Horsch, Rogers et al. 1985) steht ein einfaches und kostengünstiges Mittel zur Verfügung um heterologe Proteine in Pflanzen zu produzieren. Pflanzen bieten ein breites Spektrum an Kultivierungsmöglichkeiten. So können sie sowohl als Zellkultur in Fermentern (Loyola-Vargas and Vazquez-Flota 2006), als auch unter natürlichen Bedingungen in der Landwirtschaft gehalten werden. Sie sind attraktiver bei der Produktion von eukaryotischen Proteinen als z.B. Bakterien, da sie korrekt gefaltete funktionelle Moleküle mit den identischen Eigenschaften des ursprünglichen Proteins liefern. Dies geschieht durch die posttranslationalen Prozesse, die in der Pflanzenzelle stattfinden und die für eine optimale biologische Aktivität erforderlich sind. Des Weiteren bieten Pflanzen die Möglichkeit, das rekombinante Protein durch Einsatz von Signalpeptiden an einen bestimmten Zielort in der Pflanze zu bringen. Auch die Akkumulation und Speicherung von rekombinanten Proteinen ist so möglich. Da transgene Pflanzen das Potential besitzen große Mengen an rekombinanten Proteinen zu produzieren, stellt ihr Einsatz eine Alternative zur Produktion in tierischer Zellkultur dar. Die Produktionskosten in Pflanzen sind in Abhängigkeit von Expressionsniveau und Anbaufläche mit 1 % bis 10 % sehr günstig, wobei der größte Teil für die Aufreinigung des rekombinanten Proteins aufgewendet werden muss (Daniell, Streatfield et al. 2001). Abgesehen von den Vorteilen der heterologen Genexpression in Pflanzen gibt es auch einige Nachteile. So benötigt die Schaffung transgener stabiler homozygoter Pflanzenlinien im Gegensatz zu an-

deren Expressionssystemen viel Zeit und es können Probleme bei der Expression durch Positionseffekte, wie z.B. Silencing und abweichende Codonnutzung (Codonusage) auftreten. Neben der Verwendung der Pflanzen als Produzent für pharmazeutisch relevante und andere rekombinante Proteine ist ein weiteres Ziel der Gentechnik die Pflanze als Nährstoffproduzenten für Mensch und Tier zu verbessern.

Eine Strategie stellt die Erhöhung der Verfügbarkeit von pflanzlichen Inhaltsstoffen dar. So wurde z.B. die Disponibilität des Phosphors aus den Samen von *Triticum aestivum* L., *Hordeum vulgare* L., *Glycine max* L., *Nicotiana tabacum* L., *Arabidopsis thaliana* L. und *Zea mays* L. durch die Umwandlung der Phytinsäure in anorganisches Phosphat verbessert. Dies geschah auf mehreren Wegen. Zum einen durch die Herstellung von Mutanten mit einem gestörten Phytinsäurestoffwechsel (Larson, Young et al. 1998; Rasmussen and Hatzack 1998; Raboy, Gerbasi et al. 2000; Shi, Wang et al. 2003), zum anderen durch die Einführung heterologer Phytasegene in die Pflanze (Coello, Maughan et al. 2001; Brinch-Pedersen, Hatzack et al. 2003; Chiera, Finer et al. 2004; Brinch-Pedersen, Hatzack et al. 2006; Bilyeu, Zeng et al. 2008; Chen, Xue et al. 2008).

Eine weitere Option zur Steigerung der Ernteerträge ist die Erhöhung der Disponibilität von Nährstoffen, wie z.B. organisch gebundenem Phosphor. Die Verbesserung der Verfügbarkeit seiner Hauptkomponente im Boden, der Phytinsäure, wird durch die Einführung von Phytasen aus pflanzlichen, pilzlichen oder bakteriellen Organismen (Richardson, Hadobas et al. 2001; Yip, Wang et al. 2003; Zimmermann, Zardi et al. 2003; George, Simpson et al. 2005; Lung 2005; Wang, Wang et al. 2009) oder durch die Cokultivierung mit Phytinsäure abbauenden Bodenmikroorganismen erreicht.

## 1.7 Zielstellung

Für die Expression heterologer Gene in Pflanzen gibt es viele Anwendungsbeispiele. Dennoch ist aufgrund der Komplexität des pflanzlichen Organismus und der jeweiligen Art des Gentransfers die Auswirkung der Expression des jeweiligen rekombinanten Proteins auf die Pflanze nicht vorhersagbar.

In dieser Arbeit sollten zwei, in ihren biochemischen Eigenschaften unterschiedliche bakterielle Phytasen, in Samenpflanzen produziert werden. Dazu sollten die Gene für die saure Histidin-Phosphatase aus *Klebsiella* sp. ASR1 und die  $\beta$ -Propeller-Phytase aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* in zwei Modellpflan-

zen transformiert werden. Verschiedene Signalsequenzen sollten genutzt werden, um die Proteine zu sekretieren bzw. in die Samen zu transportieren.

Es sollte geklärt werden, wie groß der Aufwand für die Aufreinigung der Proteine ist und ob sich ihre biochemischen Eigenschaften ändern. Für jedes Protein sollte dafür eine Reinigungsstrategie mittels chromatografischer Verfahren und FPLC-Technik entwickelt werden.

Nach der Aufreinigung der Proteine sollten diese durch Molekulargewicht, spezifische Aktivität, pH-Optimum, Temperaturoptimum, Thermostabilität und kinetische Parameter charakterisiert werden.

Des Weiteren sollte die Frage geklärt werden, ob die Phytasen durch die Wurzel sekretiert werden und ob sich dadurch ein Wachstumsvorteil für die Pflanze bei Wachstum mit Phytat als einziger P-Quelle unter unsterilen Bedingungen ergibt. Die Sekretion in das Nährmedium sollte dazu nachgewiesen und Wachstumsversuche in Quarzsand durchgeführt werden.

Außerdem sollte analysiert werden, ob durch die Expression der Phytasen der Phytatgehalt der Samen sinkt und die Phytase einen Einfluss auf den Gesamtphosphorgehalt oder den Gehalt an freiem Phosphor hat.

Für die Bestimmung des Phytatgehalts sollte die HPIC-Technik genutzt werden.



## 2 Ergebnisse

### 2.1 Expression zweier bakterieller Phytasegene in Pflanzen

Da zwischen den Pflanzenklassen der Magnoliophyta große Unterschiede bestehen, wurden zur Erfassung einer größeren Bandbreite von Auswirkungen bei der Expression je ein Vertreter der Monokotylen und einer der Dreifurchenpollen-Zweikeimblättrigen transformiert. Als Vertreter der eudikotylen Pflanzen wurde *Nicotiana tabacum* und als Vertreter der monokotylen Klasse *Hordeum vulgare* L. ausgewählt. Beide Arten sind gut untersucht und mit *Agrobacterium tumefaciens* transformierbar.

#### 2.1.1 Heterologe Expression des Phytasegens *phyC* aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45

Bei der Expression von Fremdgenen in Wirtsorganismen können aufgrund der unterschiedlichen Verwendungshäufigkeit der Codons durch den Wirt im Gegensatz zur heterologen DNA-Sequenz des Fremdgens Probleme bei der Expression auftreten. Diese führen zu einem niedrigen Translationslevel oder zu einem Abbruch der Proteinbiosynthese. Um dieser Problematik gerecht zu werden, ist in dieser Arbeit die Codon usage der Wirtsorganismen mit denen der heterologen Gene verglichen worden.

##### 2.1.1.1 Überprüfung der DNA-Sequenz von *phyC* bezüglich der Triplettnutzung von *Nicotiana tabacum* und *Hordeum vulgare* mit dem Programm GCUA 2.0

Die Aminosäuresequenz der Proteine wird durch den universellen DNA-Code, die Triplets verschlüsselt. Viele der essentiellen Aminosäuren werden durch mehrere verschiedene Triplets kodiert, die sogenannten synonymen Codons. Jeder Organismus hat sein individuelles Muster bei der Nutzung des Triplet-Codes, die Codon-Präferenz. Dieses Muster wird durch die natürliche Selektion und Mutation bestimmt (Sharp and Li 1987). Um ein heterologes Gen in einem Wirt maximal zu exprimieren, muss sein Tripletmuster an das des Wirtes angepasst sein (Sharp and Li 1987). Hierzu ist es notwendig eine Referenztabelle mit Werten für die relative Nutzung von synonymen Codons (RSCU) durch einen Organismus zu erstellen (Sharp and Li 1987). Die Berechnung der RSCU-Werte erfolgt nach Sharp und Li mit folgender Formel (Sharp and Li 1987):

$$RSCU_{ij} = \frac{x_{ij}}{\frac{1}{n_i} \sum_{j=1}^{n_i} x_{ij}} \quad (1)$$

Dabei stellt  $x_{ij}$  die Anzahl des Vorkommens des  $j$ -sten Codons für die  $i$ -te Aminosäure dar und  $n_i$  ist die Anzahl der alternativen Codons für die  $i$ -te Aminosäure. Als Hilfsmittel steht eine Datenbank mit Referenztabelle unter <http://Kazusa.org.jp/codon> zur Verfügung. Diese „Codon Usage Database“ beinhaltet zurzeit die Daten von 37779 Organismen mit über 3 Millionen Protein-kodierenden Sequenzen. Für jeden erfassten Organismus werden die Daten als Codonnutzungsfrequenz und als Fraktion zur Verfügung gestellt.

Die Codonnutzungsfrequenz zeigt den Anteil an der Nutzung jedes einzelnen Triplets durch den Organismus pro 1000 Triplets an.

Die Fraktion weist den Anteil am Gebrauch des einzelnen Codons innerhalb der synonymen Codons aus (Nakamura, Gojobori et al. 2000). Mit Hilfe dieser Daten ist es möglich die Nutzungshäufigkeit eines Codons innerhalb der synonymen Codons darzustellen.

Die relative Anpassungsfähigkeit ( $w_{ij}$ ), bei der Nutzung synonymen Codons, ist die Codonnutzungsfrequenz eines Codons verglichen mit der Frequenz des optimalen Codons für diese Aminosäure im entsprechenden Organismus. Sie errechnet sich nach Sharp und Li wie folgt (Sharp and Li 1987):

$$w_{ij} = \frac{RSCU_{ij}}{RSCU_{i_{\max}}} = \frac{X_{ij}}{x_{i_{\max}}} \quad (2)$$

Hierbei sind  $RSCU_{i_{\max}}$  und  $x_{i_{\max}}$  die RSCU und  $x$  die Werte für die am häufigsten genutzten Codons für die  $i$ -te Aminosäure. Um die relative Anpassungsfähigkeit bei der Nutzung synonymen Codons grafisch darzustellen, muss das Codon mit dem höchsten  $w_{ij}$ -Wert zu 100 % gesetzt werden. Die Werte für alle anderen synonymen Codons werden dazu ins Verhältnis gesetzt (Fuhrmann, Hausherr et al. 2004). Für dieses Vorgehen wurde aus der „Codon Usage Database“ für *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 der Datensatz von FZB42 verwendet, da dieser am engsten mit FZB45 verwandt ist. Der Datensatz besteht aus 3880 Protein-codierenden Sequenzen (CDS) und fast 1,3 Millionen Codons.

Der Datensatz von *Nicotiana tabacum* enthält 1534 CDS und fast 61000 Triplets.

Für *Hordeum vulgare* wurde der Datensatz von *Hordeum vulgare* *supsp. vulgare* mit 1490 CDS und annähernd 435000 Tripletts verwendet. Aus diesen Referenztabellen wurden für jedes einzelne Codon die prozentualen  $w_{ij}$ -Werte errechnet. Diese sind in Tabelle 1 aufgeführt.

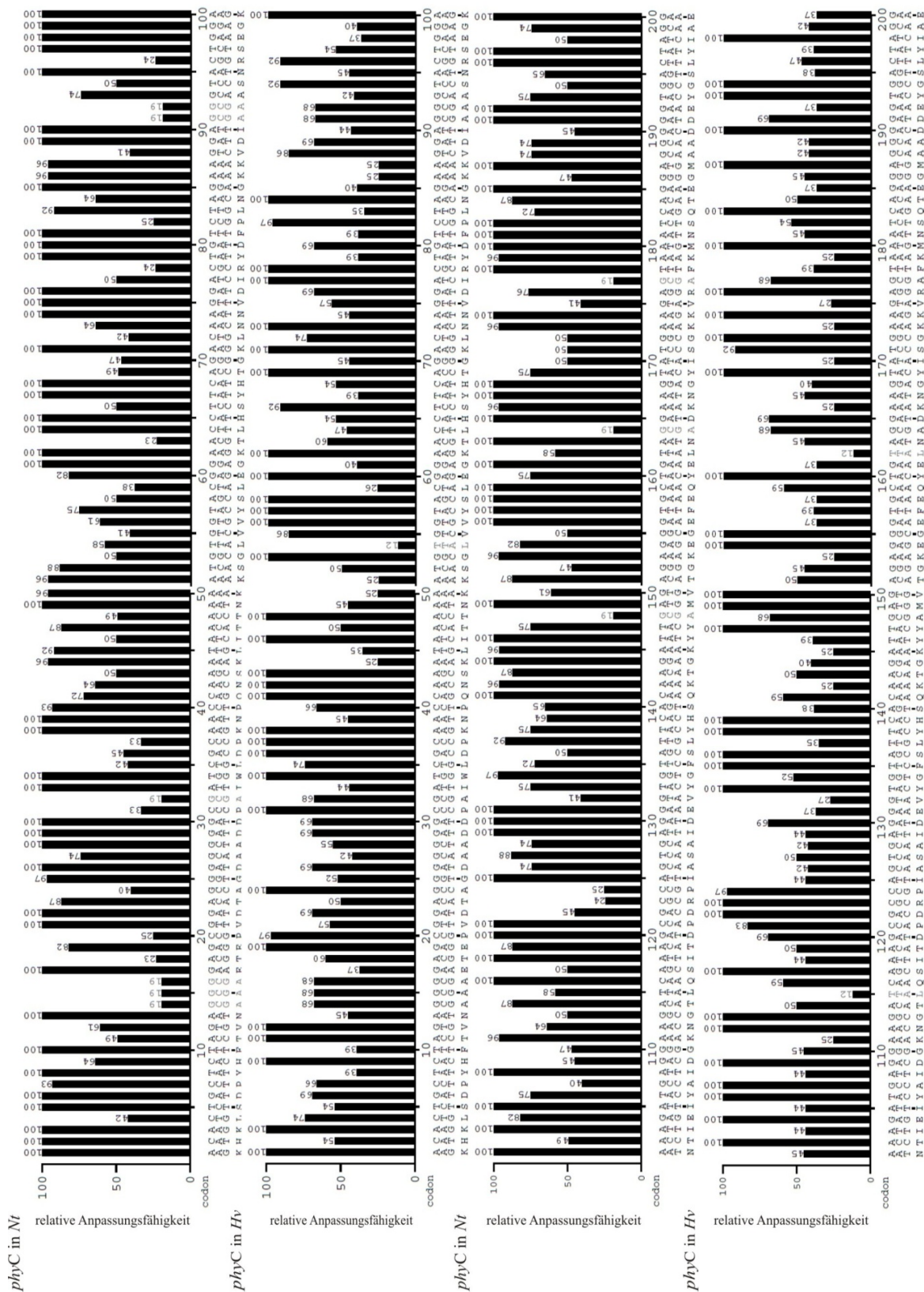
**Tabelle 1:** Vergleich der Codonnutzungsfrequenz aus der „Codon Usage Database“ und prozentuale relative Anpassungsfähigkeit  $w_{ij}$  für die Nutzung synonymer Codons von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 (FZB42) *Nicotiana tabacum* (N.t.) und *Hordeum vulgare* (H.v.). Die selten genutzten Codons sind für den jeweiligen Organismus grau unterlegt.

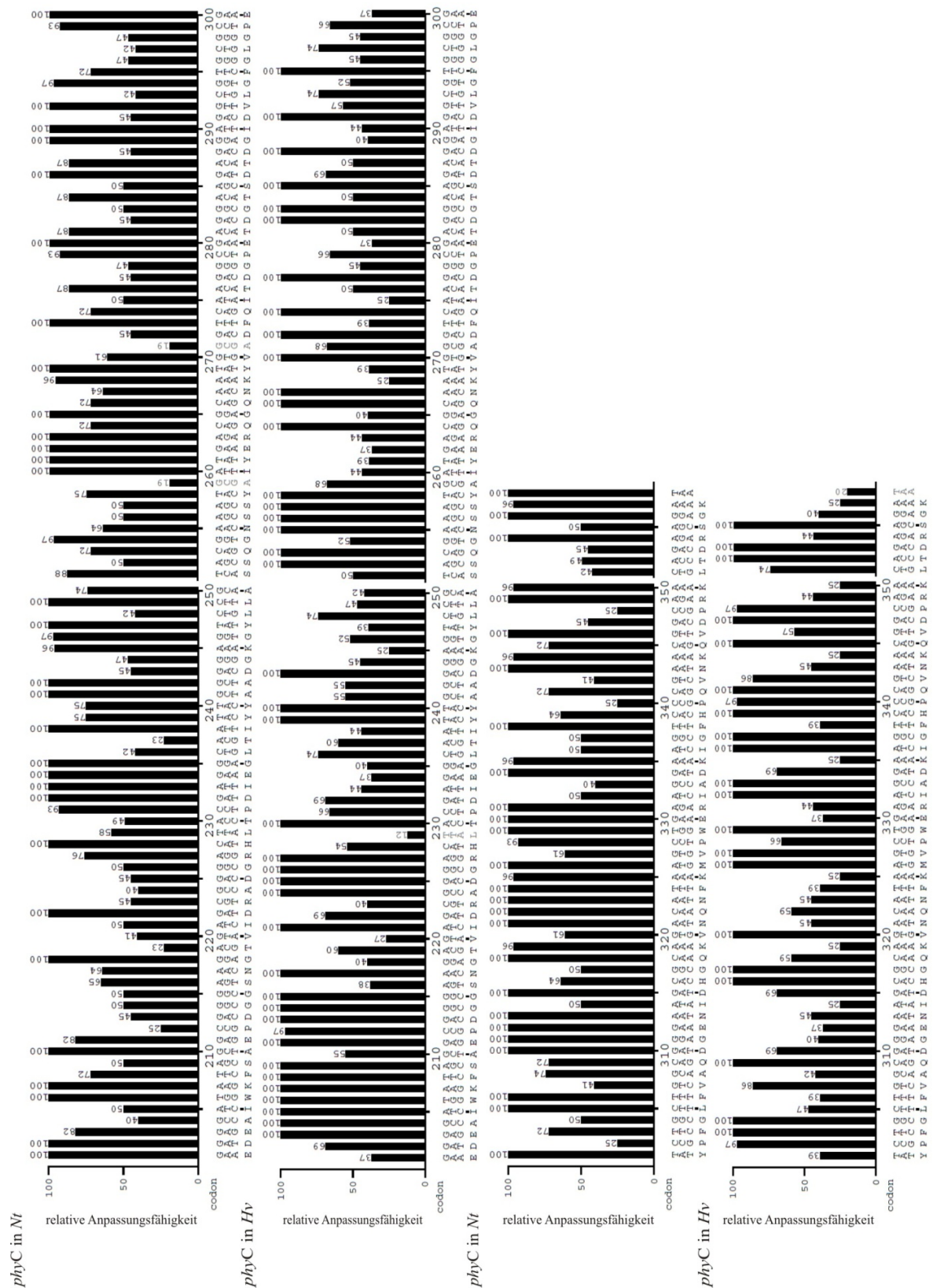
AS	CODON	FRAKTION FZB42	$W_{ij}$ [%] FZB 42	FRAKTION CODONS N.T.	$W_{ij}$ [%] N.T.	FRAKTION H.V.	$W_{ij}$ [%] H.V.
F	UUU	0,64	100	0,58	100	0,28	39
F	UUC	0,36	56	0,42	72	0,72	100
L	UUA	0,17	57	0,15	58	0,04	12
L	UUG	0,13	43	0,24	92	0,12	35
L	CUU	0,23	77	0,26	100	0,16	47
L	CUC	0,14	47	0,13	50	0,34	100
L	CUA	0,02	7	0,1	38	0,09	26
L	CUG	0,30	100	0,11	42	0,25	74
I	AUU	0,45	100	0,5	100	0,26	44
I	AUC	0,42	93	0,25	50	0,59	100
I	AUA	0,12	27	0,25	50	0,15	25
M	AUG	1,00	100	1	100	1,00	100
V	GUU	0,23	72	0,41	100	0,21	57
V	GUC	0,32	100	0,17	41	0,32	86
V	GUA	0,17	53	0,17	41	0,10	27
V	GUG	0,28	88	0,25	61	0,37	100
S	UCU	0,17	71	0,26	100	0,14	54
S	UCC	0,17	71	0,13	50	0,24	92
S	UCA	0,22	92	0,23	88	0,13	50
S	UCG	0,12	50	0,07	27	0,13	50
P	CCU	0,21	36	0,37	93	0,19	66
P	CCC	0,13	22	0,13	33	0,29	100
P	CCA	0,07	12	0,4	100	0,24	83
P	CCG	0,59	100	0,1	25	0,28	97
T	ACU	0,11	28	0,39	100	0,17	43
T	ACC	0,19	49	0,19	49	0,40	100
T	ACA	0,30	77	0,34	87	0,20	50
T	ACG	0,39	100	0,09	23	0,24	60

AS	CODON	FRAKTION FZB42	W <sub>II</sub> [%] FZB 42	FRAKTION CODONS <i>N.T.</i>	W <sub>II</sub> [%] <i>N.T.</i>	FRAKTION <i>H.V.</i>	W <sub>II</sub> [%] <i>H.V.</i>
A	GCU	0,18	53	0,43	100	0,21	55
A	GCC	0,27	79	0,17	40	0,38	100
A	GCA	0,20	59	0,32	74	0,16	42
A	GCG	0,34	100	0,08	19	0,26	68
Y	UAU	0,61	100	0,57	100	0,28	39
Y	UAC	0,39	64	0,43	75	0,72	100
Stop	UAA	0,60	100	0,42	100	0,14	20
Stop	UAG	0,13	22	0,19	45	0,16	23
H	CAU	0,65	100	0,61	100	0,35	54
H	CAC	0,35	54	0,39	64	0,65	100
Q	CAA	0,43	75	0,58	100	0,37	59
Q	CAG	0,57	100	0,42	72	0,63	100
N	AAU	0,53	100	0,61	100	0,31	45
N	AAC	0,47	89	0,39	64	0,69	100
K	AAA	0,73	100	0,49	96	0,20	25
K	AAG	0,27	37	0,51	100	0,80	100
D	GAU	0,58	100	0,69	100	0,41	69
D	GAC	0,42	72	0,31	45	0,59	100
E	GAA	0,70	100	0,55	100	0,27	37
E	GAG	0,30	43	0,45	82	0,73	100
C	UGU	0,41	69	0,58	100	0,32	47
C	UGC	0,59	100	0,42	72	0,68	100
Stop	UGA	0,27	45	0,39	93	0,69	100
W	UGG	1,00	100	1	100	1,00	100
R	CGU	0,16	70	0,15	45	0,10	40
R	CGC	0,23	100	0,08	24	0,25	100
R	CGA	0,06	26	0,11	33	0,06	24
R	CGG	0,23	100	0,08	24	0,23	92
S	AGU	0,09	38	0,17	65	0,10	38
S	AGC	0,24	100	0,13	50	0,26	100
R	AGA	0,23	100	0,33	100	0,11	44
R	AGG	0,09	39	0,25	76	0,25	100
G	GGU	0,16	43	0,33	97	0,22	52
G	GGC	0,37	100	0,17	50	0,42	100
G	GGA	0,31	84	0,34	100	0,17	40
G	GGG	0,16	43	0,16	47	0,19	45

Alle Codons, die eine geringere relative Anpassungsfähigkeit als 30 % aufweisen, gelten als selten genutzte Tripletts. *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 verwendet die Tripletts CUA (7 %), AUA (27 %), CCC (22 %), CCA (22 %), ACU (28 %), CGA (26 %) und das Stopcodon UAG (22 %) selten. Für *Nicotiana tabacum* sind das die Codons UCG (27 %), CCG (25 %), ACG (23 %), GCG (19 %), CGC (24 %) und CGG (24 %). *Hordeum vulgare* nutzt folgende Codons relativ selten: UUA (12 %), CUA (26 %), AUA (25 %), GUA (27 %), AAA (25 %), CGA (24 %) und die beiden Stopcodons UAA (20 %) und UAG (23 %).

Mit Hilfe des Programms GCUA Version 2.0 (Fuhrmann, Hausherr et al. 2004) wurde die relative Anpassungsfähigkeit der Tripletts von *phyC* ohne Signalsequenz gegen die des jeweiligen Wirts abgeglichen. Das Programm ist in der Lage die relative Anpassungsfähigkeit des jeweiligen zu exprimierenden Gens an das Triplettmuster des Wirtes zu berechnen und grafisch darzustellen. Hierzu verwendet es die Referenztabelle mit den RSCU-Werten für den Wirt aus der „Codon Usage Database“ und die Protein-codierende Sequenz des Gens und kalkuliert daraus die relative Anpassungsfähigkeit für die synonymen Tripletts. Mit Hilfe dieses Programms wurde die Abbildung 4 erstellt. Sie zeigt die relative Anpassungsfähigkeit von *phyC* an die Triplettnutzung von *Nicotiana tabacum* und *Hordeum vulgare* für jedes einzelne Codon. Aus ihr geht hervor, dass sich wie zu erwarten, die Codon-Präferenz von *phyC* von der der beiden Wirtsorganismen unterscheidet. Wie aus der Abbildung 4 ersichtlich, enthält die Sequenz von *phyC* 25 für *Nicotiana tabacum* seltene Codons. Darunter befindet sich 11mal das Codon GCG, welches mit 19 % den für *Nicotiana tabacum* niedrigsten  $w_{ij}$ -Wert besitzt. Es tritt am Anfang der Gensequenz an den Positionen 14,15,16 und an den Positionen 91 und 92 auf, die restlichen sind über die Sequenz verteilt. Für *Hordeum vulgare* befinden sich in der Gensequenz von *phyC* 35 seltene Tripletts. Das Codon UUA, mit dem für *Hordeum vulgare* niedrigsten  $w_{ij}$ -Wert von 12 %, ist 4mal innerhalb der Sequenz an den Positionen 54, 115, 162 und 229 vorhanden.

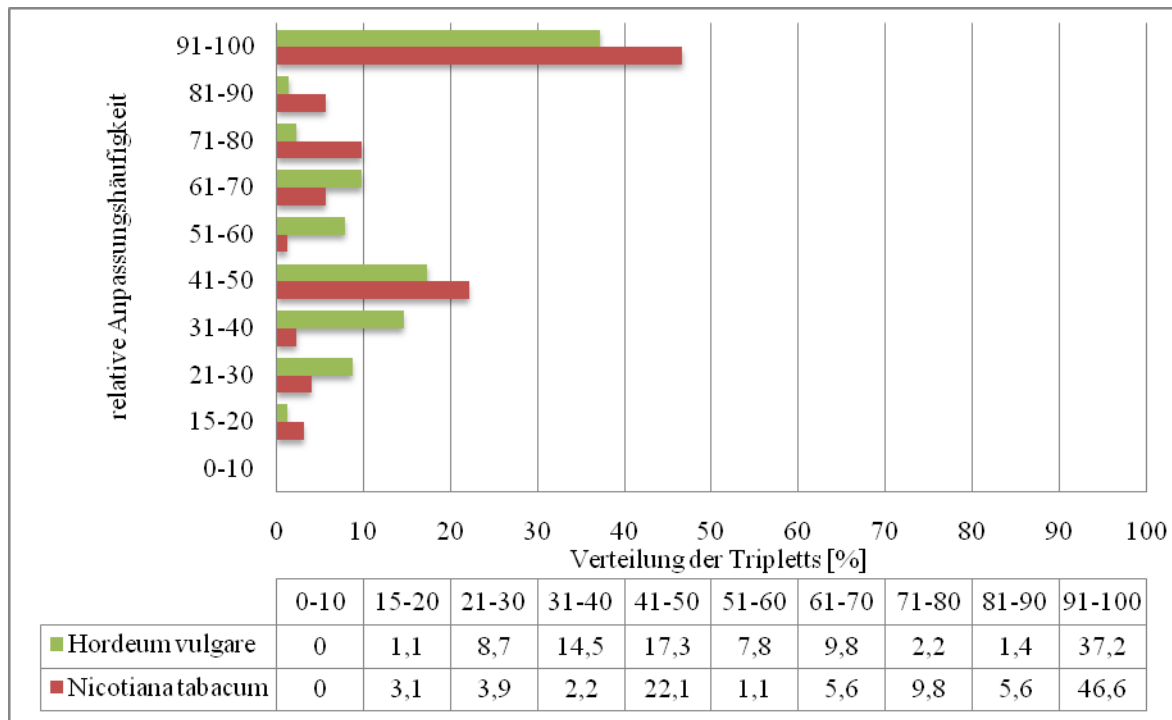




**Abbildung 4:** Mit dem Programm GCUA Version 2.0 berechnete relative Anpassungsfähigkeit von *Nicotiana tabacum* (Nt) und *Hordeum vulgare* (Hv) bei der Expression von *phyC* aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45. Die y-Achse zeigt die relative Anpassungsfähigkeit in [%]. Hierbei ist für jede Aminosäure das Triplet mit der größten Nutzungshäufigkeit 100 % gesetzt worden, die weiteren synonymen Triplets sind in ihrer Häufigkeit prozentual dazu dargestellt. Die x-Achse zeigt die DNA-Sequenz in Triplets und die jeweilige Aminosäure im 1 Buchstabenkode.



Teilt man die Triplets entsprechend der Codon-Präferenz von *Nicotiana tabacum* bzw. *Hordeum vulgare* in Gruppen ein (Abbildung 5), wird ersichtlich, dass der Anteil dieser wenig verwendeten Codons für *phyC* in *Nicotiana tabacum* 6,9 % und für *Hordeum vulgare* 9,8 % beträgt. Der Anteil der für *Nicotiana tabacum* optimalen Codons entspricht 46,6 % und für *Hordeum vulgare* nur 37,2 %.

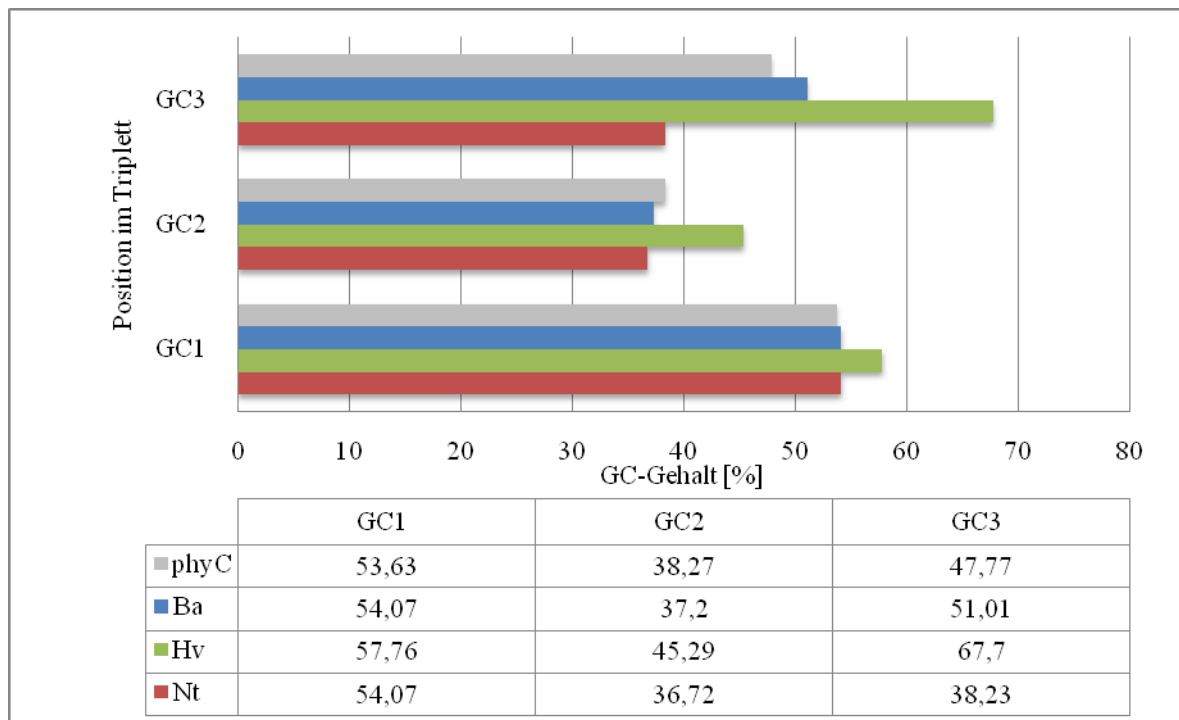


**Abbildung 5:** Prozentuale Verteilung der Triplets von *phyC* in Abhängigkeit von der Codon-Präferenz von *Nicotiana tabacum* bzw. *Hordeum vulgare*.

Ein weiterer Parameter mit dem man eine Aussage über die Expriemierbarkeit eines Gens in einem heterologen System treffen kann, ist der durchschnittliche GC-Gehalt eines Gens sowie der GC-Gehalt an der jeweiligen Position der Triplets. Denn GC-Gehalt und die Codonnutzung korrelieren mit der Höhe der Genexpression (Bulmer 1990; Fennoy and Bailey-Serres 1993). Als dikotyle Pflanze hat *Nicotiana tabacum* einen eher niedrigen GC-Gehalt von ca. 43 % mit 54,07 % an Position 1, 36,72 % an Position 2 und 38,23 % an Position 3 (Kawabe and Miyashita 2003). Der durchschnittliche GC-Gehalt von Genen in in monokotylen Pflanzen liegt meist deutlich höher, so beträgt er bei *Hordeum vulgare* im Durchschnitt 56,92 % mit 57,76 % an Position 1, 45,29 % an Position 2 und 67,7 % an Position 3. Für Gene mit hohem Transkriptionslevel ist der durchschnittliche GC-Gehalt mit ca. 58,33 % mit 60,10 % an Position 1, an Position 2 42,85 % und an der dritten Position 72,01 % etwas höher (Wang and Roossinck 2006). Der durchschnittliche GC-Gehalt von *phyC* liegt bei 46,65 % mit 53,63 % an Position 1, 38,27 % an Position 2 und 47,77 %



an Position 3 und entspricht damit eher dem GC-Gehalt von *Nicotiana tabacum* als dem von *Hordeum vulgare* (Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Vergleich des durchschnittlichen GC-Gehalts an den 3 Positionen der Codons von *phyC*, *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 (*Ba*), *Nicotiana tabacum* (*Nt*), und *Hordeum vulgare* (*Hv*).

Mit Hilfe des Codonadaptationsindex (CAI) ist es möglich Vergleiche innerhalb und zwischen Organismen bezüglich ihrer Codon-Präferenz zu erstellen. Der CAI berechnet sich aus dem Durchschnitt der relativen Anpassungsfähigkeiten. Mit seiner Hilfe kann man ebenfalls eine Aussage über die mögliche Expressierbarkeit eines heterologen Gens in einem Organismus bzw. die Expressionsstärke von Genen innerhalb eines Organismus treffen. Da t-RNAs für häufig genutzte Tripletts im Organismus reichlicher vorhanden sind als für selten verwendete, enthalten hochexprimierte Gene in ihrer Gensequenz mehr häufiger genutzte Codons. In moderat exprimierten Genen hingegen ist die Codonnutzung ausgeglichener, d.h. es sind auch selten genutzte Codons vorhanden. Enthält eine Gensequenz nur häufige also optimale Codons beträgt der CAI 1,0.

Für *phyC* in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 ergibt sich ein CAI-Wert von 0,81.

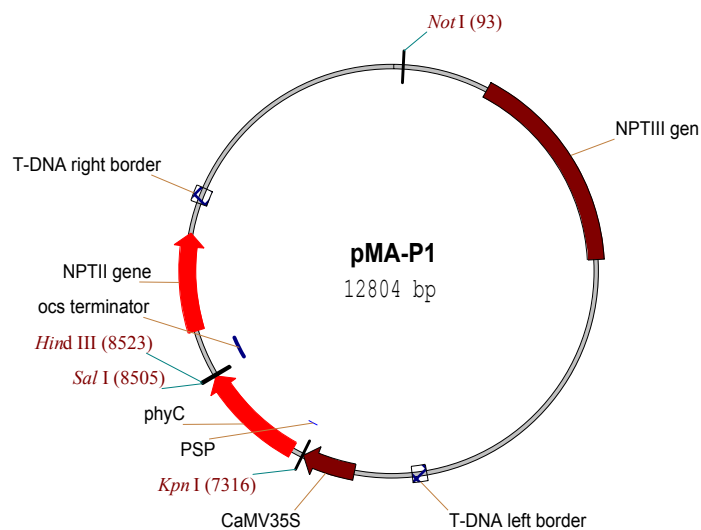
Je niedriger der CAI für ein zu exprimierendes Gen in Bezug auf den Wirtsorganismus ist, umso größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Expression abgeschwächt oder gar nicht erfolgt.

Für *phyC* in *Nicotiana tabacum* beträgt der CAI 0,75 und für *Hordeum vulgare* 0,67.

### 2.1.1.2 Expression von *phyC* in *Nicotiana tabacum*

#### 2.1.1.2.1 Klonierungsstrategie für *phyC*

Das Phytasegen *phyC* aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 wurde mit den Primern KR8 und KR9 aus chromosomaler DNA des Stammes amplifiziert. Das Fragment wurde mit *Bgl*II und *Sal*I verdaut und über die *Bam*HI und die *Sal*I Schnittstellen in den binären Vektor pMA vor die Signalsequenz des Proteinaseinhibitors II aus *Solanum tuberosum* ligiert. Das neu entstandene Konstrukt, unter Kontrolle des 35S-CaMV Promotors, erhielt den Namen pMA-P1 (Abbildung 7). Der binäre Vektor pMA basiert auf dem binären Vektor Bin19 (Bevan 1984). Das Konstrukt konnte durch Sequenzierung überprüft und in den nicht Tumor-induzierenden *Agrobacterium tumefaciens* Stamm pGV2260 transformiert werden. Der daraus resultierende Stamm bekam die Bezeichnung pGV2260-pMA-P1. Der binäre Vektor trägt innerhalb der DNA-Region, die in das pflanzliche Genom integriert wurde, neben dem Phytasegen *phyC* ein Kanamycinresistenzgen *nptII* für die spätere Selektion.



**Abbildung 7:** Das Konstrukt pMA-P1 zur Transformation von *Nicotiana tabacum* mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. Das Gen *phyC* aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 befindet sich zwischen dem Signalpeptid des Proteinaseinhibitors II (PSP) aus *Solanum tuberosum* und dem ocs-Terminator unter der Kontrolle des CaMV-35S Promotors.

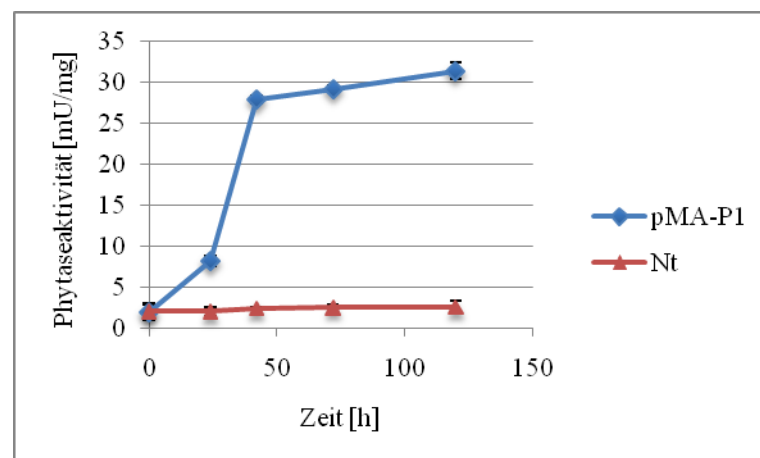
#### 2.1.1.2.2 Transformation und Expression von *phyC*

##### 2.1.1.2.2.1 Expressionskontrolle durch transiente Expression von *phyC*

Mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* ist es nicht nur möglich heterologe Gene stabil in das Genom von Pflanzen zu übertragen, sondern auch diese für Expressionsanalysen als nicht integrierte Kopien im Zellkern zu exprimieren (Kapila, De Rycke et al. 1997). Dies

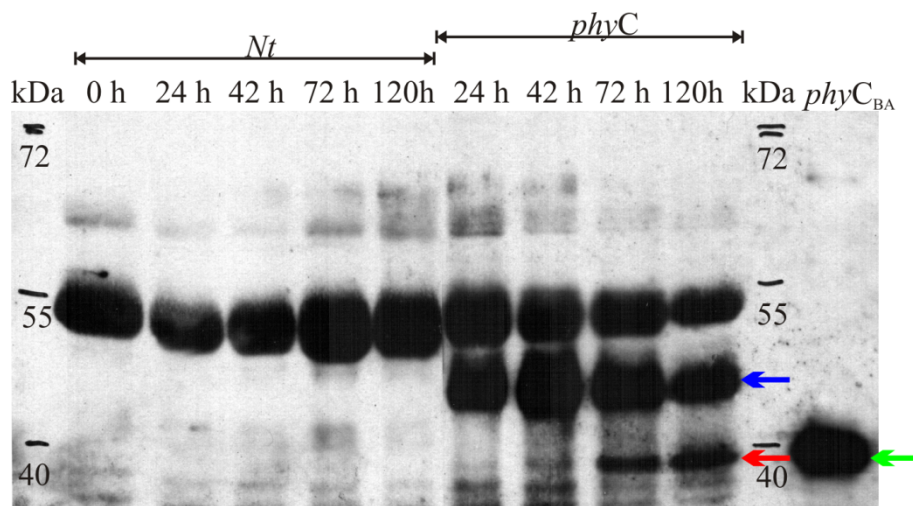
hat den Vorteil, dass die Expression schon kurz nach der DNA-Übertragung gemessen und Positionseffekte ausgeschlossen werden können. Außerdem ist die Genexpression unabhängig von der Regeneration von transgenen Pflanzen (Kapila, De Rycke et al. 1997). Die Expressionsbarkeit der im Vektor pMA-P1 befindlichen Kasette wurde mittels transienter Expression von intakten *Nicotiana tabacum* Blättern mit dem Stamm pV2260-pMA-P1 überprüft. Hierzu wurden die Phytaseaktivitäten in den mit *Agrobacterium tumefaciens* pGV2260 infiltrierten Blättern zu verschiedenen Zeiten nach Infiltration gemessen. Als Kontrolle wurden *Nicotiana tabacum* Blätter mit Puffer behandelt. Die Phytaseaktivitäten wurden mit dem Standardaktivitätstest bei pH 7 und 37 °C bestimmt. Die Messung der Phytaseaktivitäten ist vor der Infiltration mit pGV2260-pMA-P1 und 24 h, 42 h, 72 h und 120 h nach der Infiltration erfolgt.

Die Phytaseaktivität steigt im Verlauf der Expressionsdauer erst schnell und dann immer langsamer an (Abbildung 8). Die Phytaseaktivitäten liegen zwischen 9 mU/mg nach 24 h und 31 mU/mg nach 120 h. Die Kontrolle zeigt bei pH 7 eine leichte Hintergrundaktivität, die um ca. 2 mU/mg schwankt.



**Abbildung 8:** *Agrobacterium* vermittelte transiente Expression der Expressionskasette von pMA-P1 in *Nicotiana tabacum* Blättern. Es sind die Phytaseaktivitäten des exprimierten *phyC*-Gens (pMA-P1, blau) und als Kontrolle mit dem Puffer infiltrierte *Nicotiana tabacum* Blätter (Nt, braun) dargestellt.

Parallel zu den Phytaseaktivitätsmessungen wurde PhyC in den Blättern mit Hilfe der Westernblot-Analyse aus denselben Proben nachgewiesen. Die Phytasebande, die in ihrer Größe der Positiv-Kontrolle entspricht, ist nach 24 h und 42 h nachweisbar und nimmt mit der Zeit stetig an Intensität zu. Die Bande, die im Gegensatz zur Positiv-Kontrolle einen langsameren Lauf im SDS-Gel und somit ein scheinbar höheres Molekulargewicht aufweist ist nach 24 h deutlich nachweisbar, nimmt innerhalb der 42 h Expressionsdauer zu und wird dann schwächer.

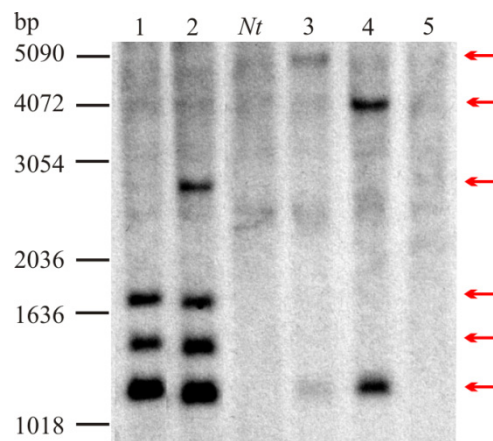


**Abbildung 9:** Transiente Expression des Konstrukts pMA-P1 in *Nicotiana tabacum*. Die obere rekombinante PhyC-Bande ist mit einem blauen Pfeil und die untere Bande mit einem roten Pfeil gekennzeichnet. Als Negativ-Kontrolle wurde Totalproteinextrakt nicht transformierter *Nicotiana tabacum* Blätter verwendet. Als Positiv-Kontrolle ist aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 aufgereinigtes PhyC aufgetragen worden (grüner Pfeil).

#### 2.1.1.2.2.2 Stabile Integration in das Genom von *Nicotiana tabacum*

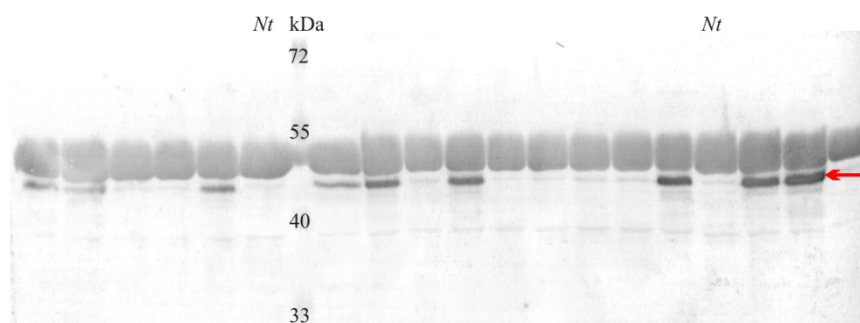
Die im Vektor pMA-P1 enthaltene Expressionskassette konnte mit Hilfe von pV2260-pMA-P1 stabil in das Genom von *Nicotiana tabacum* integriert werden. Aus dem transformierten Blattgewebe und den sich daraus bildenden Kalli wurden pro Konstrukt ca. 80 Kanamycin-resistente Pflanzen regeneriert und im Gewächshaus auf Einheitserde kultiviert.

Um die Insertion in das Genom nachzuweisen, wie in Abbildung 10 beispielhaft dargestellt, wurden Southernblots durchgeführt. In der Erkennungssequenz für die P<sup>32</sup>-markierte Phytasesonde liegt ein *Eco*RI-Schnittort, weshalb pro Integrationsort zwei Fragmente entstehen. Das eine Fragment hat eine Größe von 1200 bp, die Größe des anderen Fragments schwankt je nach Integrationsort. Da die Transformation mit *Agrobacterium tumefaciens* durchgeführt wurde, sind Mehrfachintegrationen möglich. In Abbildung 10 tragen die Linien 1 und 2 mehrere Kopien des Phytasegens. Die Linie 1 zeigt 3 Banden und damit 2 Integrationsorte, die Linie 2 hat 4 Banden und trägt somit 3 Integrationen. Die Linien 3 und 4 zeigen eine einfache Integration und die Linie 5 enthält kein Phytasegen.



**Abbildung 10:** Southernblot mit  $P^{32}$ -markierter Sonde zur Klärung der Anzahl der Insertionen des Phytasegens *phyC* in das Genom von *Nicotiana tabacum*. Die roten Pfeile kennzeichnen die von der Sonde dedektierten Fragmente der Linien 1 bis 5. Als Kontrolle ist mit *EcoRI* verdaute genomische DNA des Wildtyps (Nt) mitgeführt worden.

Da mit Hilfe der Southernblotanalyse zwar die Integration des heterologen Gens aber nicht seine Expression nachgewiesen werden kann, wurden die Linien zusätzlich mit Hilfe der Westernblot-Technik analysiert. Im Screeningbeispiel (Abbildung 11) läuft die Phytasebande zwischen 55 und 40 kDa.



**Abbildung 11.:** Westernblotanalyse von *Nicotiana tabacum* pMA-P1 Linien. Die mit dem roten Pfeil gekennzeichnete Bande ist die Expressionsbande von PhyC. Als Kontrolle ist Gesamtprotein vom Wildtyp (Nt) mitgeführt worden.

Die Pflanzen, die sowohl im Southernblot als auch im Westernblot positiv waren, waren die Basis für weitere Untersuchungen.

### 2.1.1.3 Expression von *phyC<sub>cop</sub>* aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 in *Hordeum vulgare* L. cv. Golden Promise

#### 2.1.1.3.1 Veränderung der DNA-Sequenz durch Verwendung synonymer Triplets in Anpassung an die Nutzungshäufigkeit der Triplets durch *Hordeum vulgare*

Um *phyC* in *Hordeum vulgare* L. zu exprimieren, wurde der Triplettcode verändert. Von *Hordeum vulgare* selten genutzte Triplets wurden gegen häufiger verwendete Triplets in

der Sequenz ausgetauscht. Dazu wurde der „Codon Usage Database“ die Codon-Präferenz von *Hordeum vulgare* entnommen und die relative Anpassungsfähigkeit  $w_{ij}$  für jedes Triplet berechnet. Die Ergebnisse der Veränderung sind in Tabelle 2 aufgeführt. Durch Austausch von A bzw. T gegen G bzw. C, hauptsächlich in der dritten Position der synonymen Triplets, wurde der GC-Gehalt des Phytasegens von 46,65 % auf 63,12 % angehoben. Das codonveränderte Gen wurde mit *phyC<sub>cop</sub>* bezeichnet.

**Tabelle 2:** Vergleich der Codon-Präferenz von *phyC* und *phyC<sub>cop</sub>* mit der Triplettnutzung von *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* (H.v.) mit Hilfe der Codon Usage Database <http://Kazusa.org.jp/codon>. Die Codon-Präferenz ist in Fraktionen dargestellt.

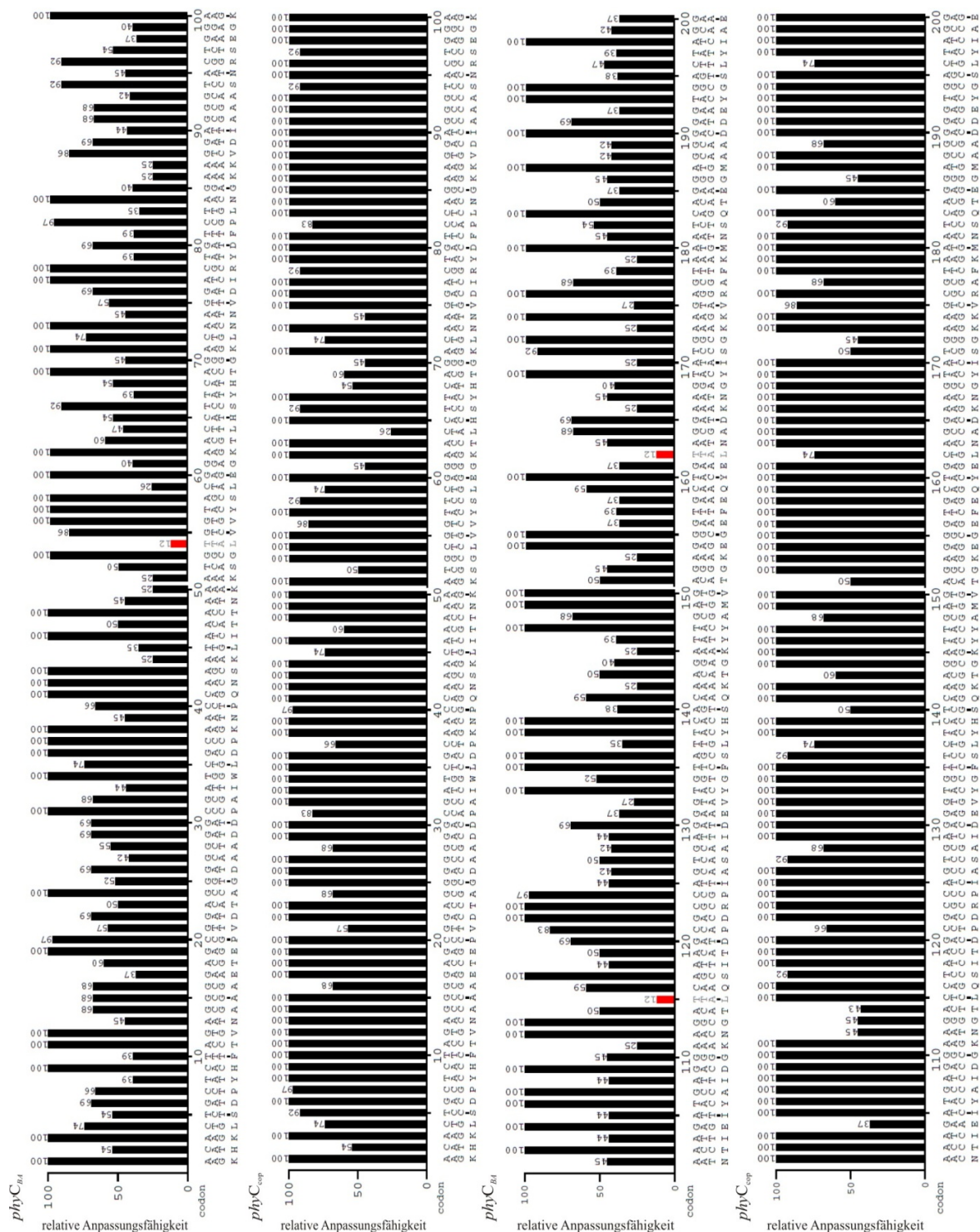
AS	CODON	ANZAHL IN <i>phyC</i>	ANZAHL IN <i>phyC<sub>cop</sub></i>	$W_{ij}$ [%] <i>Hordeum vulgare</i>
F	UUU	8	0	39
F	UUC	4	12	100
L	UUA	4	0	12
L	UUG	3	0	35
L	CUU	4	0	47
L	CUC	0	9	100
L	CUA	1	1	26
L	CUG	8	10	74
I	AUU	12	0	44
I	AUC	7	22	100
I	AUA	3	0	25
M	AUG	4	4	100
V	GUU	4	2	57
V	GUC	4	5	86
V	GUA	3	0	27
V	GUG	6	10	100
S	UCU	3	0	54
S	UCC	3	12	92
S	UCA	3	0	50
S	UCG	0	4	50
P	CCU	6	3	66
P	CCC	2	5	100
P	CCA	1	3	83
P	CCG	7	5	97
T	ACU	0	2	43
T	ACC	6	13	100
T	ACA	11	1	50
T	ACG	4	5	60
A	GCU	4	0	55

AS	CODON	<i>ANZAHL IN phyC</i>	<i>ANZAHL IN phyC<sub>cop</sub></i>	<i>W<sub>ij</sub> [%] Hordeum vulgare</i>
A	GCC	5	18	100
A	GCA	9	0	42
A	GCG	11	11	68
Y	UAU	9	1	39
Y	UAC	11	19	100
Stop	UAA	1	1	20
Stop	UAG	0	0	23
H	CAU	4	3	54
H	CAC	4	5	100
Q	CAA	5	0	59
Q	CAG	9	14	100
N	AAU	13	1	45
N	AAC	7	19	100
K	AAA	20	0	25
K	AAG	8	28	100
D	GAU	19	0	69
D	GAC	14	33	100
E	GAA	16	2	37
E	GAG	6	20	100
C	UGU	0	0	47
C	UGC	0	0	100
Stop	UGA	0	0	100
W	UGG	3	3	100
R	CGU	1	0	40
R	CGC	2	6	100
R	CGA	0	0	24
R	CGG	1	2	92
S	AGU	3	1	38
S	AGC	10	5	100
R	AGA	4	0	44
R	AGG	2	2	100
G	GGU	5	1	52
G	GGC	12	23	100
G	GGA	11	0	40
G	GGG	8	12	45

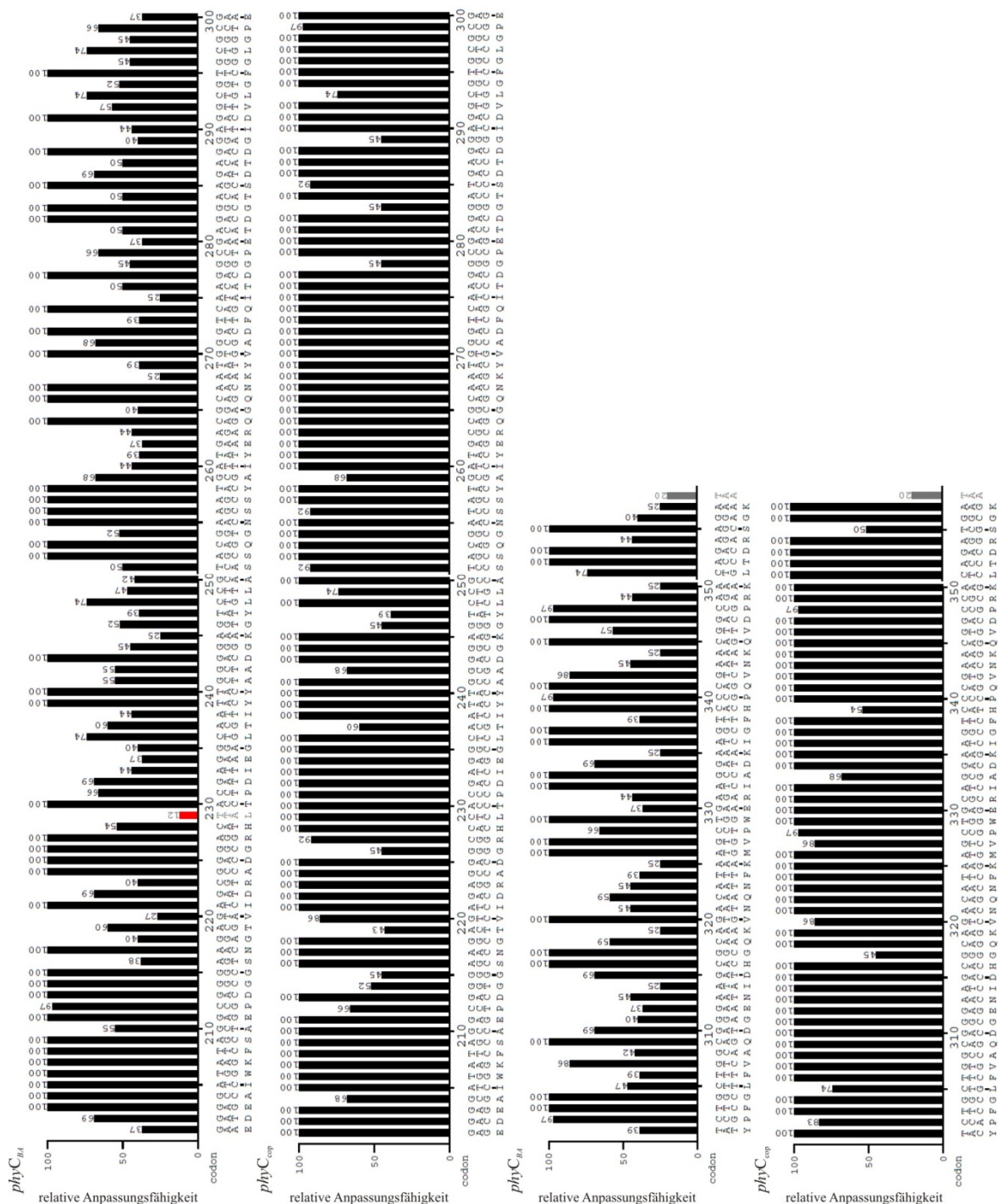
Die mit dem Programm GCUA Version 2.0 berechnete relative Anpassungsfähigkeit von *Hordeum vulgare* (Abbildung 12) bei der Translation von *phyC* und *phyC<sub>cop</sub>* zeigt, dass einige der Triplets von *phyC* nur selten von *Hordeum vulgare* genutzt werden. Dagegen



wurde die codonoptimierte Variante in ihrem GC-Gehalt und in der Wahl der Triplets an *Hordeum vulgare* angepasst. So enthält die codonveränderte Variante nicht mehr das durch *Hordeum vulgare* am seltensten genutzte Triplett UUA.

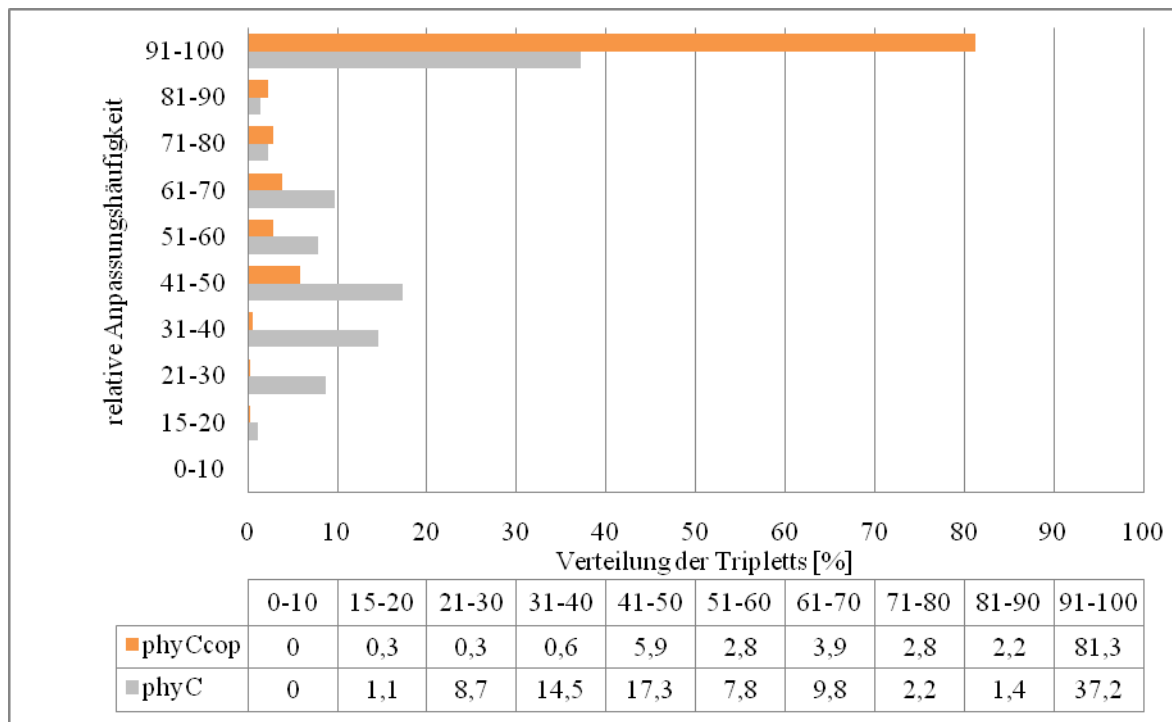






**Abbildung 12:** Vergleich der relativen Anpassungsfähigkeit von *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* bei der Triplettnutzung von *phyC* aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 (*phyC<sub>BA</sub>*) und der codonveränderten Variante von *phyC* (*phyC<sub>cop</sub>*). Die y-Achse zeigt die relative Anpassungsfähigkeit in [%]. Hierbei ist für jede Aminosäure das Triplet mit der größten Nutzungshäufigkeit 100 % gesetzt worden, die weiteren synonymen Tripletts sind in ihrer Häufigkeit prozentual dazu dargestellt. Die Tripletts die weniger als 15 % genutzt werden, sind rot dargestellt, solche mit weniger oder gleich 20 % in grau. Die x-Achse zeigt die DNA-Sequenz in Tripletts und die jeweilige Aminosäure im 1 Buchstabenkode.

Nach Einteilung der Tripletts von *phyC* und *phyC<sub>cop</sub>* in Gruppen bezüglich der Codonpräferenz von *Hordeum vulgare* können über 80 % der Codons von *phyC<sub>cop</sub>* der Gruppe der optimalen Codons zugeordnet werden (Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Vergleich der prozentualen Verteilung der Triplets von *phyC* (grau) und *phyC<sub>cop</sub>* (orange) in Abhängigkeit von der Codon-Präferenz von *Hordeum vulgare*.

#### 2.1.1.3.2 Konstruktion des Codon-veränderten *phyC*-Gens

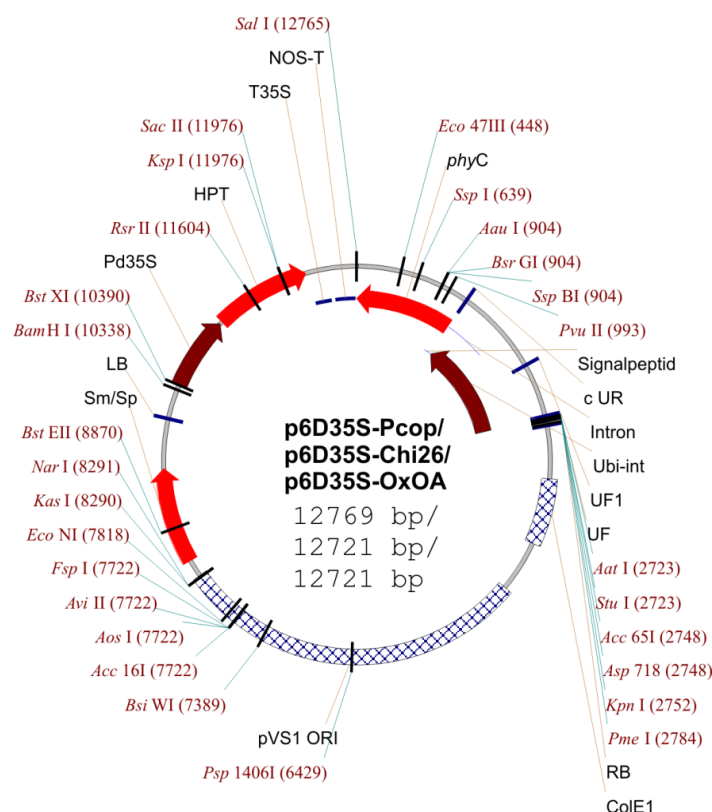
Die doppelsträngige veränderte DNA-Sequenz ohne Signalpeptid wurde in 23 DNA-Stücke mit jeweils ca. 100 Basen aufgeteilt und neu synthetisiert. Die Synthese, HPLC-Reinigung und Phosphorylierung der 23 Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Eurogentec. Die Oligonukleotide wurden anschließend ligiert. Das Ligationsprodukt wurde mittels PCR zur Klonierung verschiedener Konstrukte eingesetzt. Vor das veränderte Gen wurden verschiedene Signalpeptide mittels SOE-PCR eingefügt. Die PCR-Produkte konnten über die mit den Primern eingeführten Schnittstellen *PstI* und *SacI* in den Vektor pUC18 mit Hilfe des „Rapid Ligation Kit“ von MBI Fermentas nach Herstellerangaben ligiert und danach sequenziert werden.

#### 2.1.1.3.3 Fusion von *phyC<sub>cop</sub>* mit verschiedenen Signalpeptiden und Klonierung in den Vektor p6D35S

*phyC<sub>cop</sub>* wurde mit verschiedenen Signalpeptiden fusioniert, mit dem Ziel das Genprodukt an verschiedene Stellen im Wirtsorganismus zu transportieren. Hierzu wurde die Signalsequenz des Proteinaseinhibitors II von *Solanum tuberosum* (Komarnytsky, Borisjuk et al. 2000), die Signalsequenz des Endochitinasegens *chi26* von *Hordeum vulgare* (Leah, Tom-

merup et al. 1991) und die Signalsequenz des Oxalatoxidasegens *OxOA* von *Hordeum vulgare* (Zhou, Zhang et al. 1998; Wu, Druka et al. 2000) verwendet.

Anschließend wurde das Phytasegen in den Vektor UBIP-ABM hinter den Ubiquitin-Promotor aus Mais (Christensen, Sharrock et al. 1992) und vor den *nos*-Terminator über die Schnittstellen *Bam*HI und *Sal*I kloniert. Der Ubiquitin-Promotor ist konstitutiv (Christensen, Sharrock et al. 1992) und in allen Geweben der Pflanze aktiv (Takimoto, Christensen et al. 1994). Er zeigt im Gegensatz zum 35S-CaMV-Promotor in monokotylen Pflanzen eine bis zu 10fach höhere Expression des jeweiligen Gens (Christensen, Sharrock et al. 1992). Die Kassetten mit Ubiquitinpromotor, Signalpeptid, Phytasegen und *nos*-Terminator wurde über die beiden *Sfi*-Schnittorte aus dem Vektor ausgeschnitten und in den Vektor p6D35S eingefügt. Die neu entstandenen Konstrukte wurden mit p6D35S-Pcop, p6D35S-Chi26 und p6D35S-OxOA bezeichnet. Der binäre Vektor p6D35S enthält zwischen der linken und der rechten Border der T-DNA-Region ein Hygromycinresistenzgen unter Kontrolle des doppelten CaMV 35S Promotors (Kay, Chan et al. 1987) für die Selektion der transgenen *Hordeum vulgare* Pflanzen (Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Die Abbildung zeigt die Konstrukte p6D35S-Pcop, p6D35S-Chi26 und p6D35S-OxOA zur Transformation von *Hordeum vulgare* mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* AGL1. Das Codonveränderte Gen *phyC<sub>cop</sub>* befindet sich zwischen dem jeweiligen Signalpeptid und dem *nos*-Terminator (NOS-T) unter der Kontrolle des Ubiquitinpromotors (Ubi-int).

#### **2.1.1.3.4 Transformation von p6D35S-P<sub>cop</sub>/Chi26/OxOA und Selektion der transgenen *Hordeum vulgare* Pflanzen**

Die im Vektor enthaltene Expressionskassette wurde mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 auf unreife Embryos von *Hordeum vulgare* übertragen. Aus den Embryos wurden pro Konstrukt ca. 100 vollständige Pflanzen regeneriert. Die genomische DNA wurde aus den Blättern der Pflanzen isoliert und mittels PCR auf das Vorhandensein des Hygromycinresistenzgens überprüft. Da immer die gesamte T-DNA in das Genom der Pflanzen integriert wird, ist davon auszugehen, dass alle Pflanzen, die das Hygromycinresistenzgen enthalten auch das Phytasegen tragen. Weil aber die Integration der T-DNA auch bei *Hordeum vulgare* an beliebiger Stelle im Genom erfolgt, können Positionseffekte auftreten (Kapila, De Rycke et al. 1997). So bedeutet die Integration der Kassette nicht, dass eine Expression des Phytasegens erfolgt. Deshalb wurden die PCR-positiven Pflanzen mittels Westernblot-Analyse mit spezifischen Antikörpern gegen die Phytase getestet. Die *phyC<sub>cop</sub>* exprimierenden Pflanzen wurden weiteren Untersuchungen unterzogen.

#### **2.1.2 Expression des Phytasegens *phyK* aus *Klebsiella pneumoniae* ASR1**

##### **2.1.2.1 Überprüfung der DNA-Sequenz von *phyK* bezüglich der Codon-Präferenz von *Nicotiana tabacum* L. und *Hordeum vulgare* L.**

Auch für *phyK* wurde die DNA-Sequenz bezüglich der Codonpräferenz der Wirtsorganismen *Nicotiana tabacum* und *Hordeum vulgare* analog überprüft. Dazu wurde aus der „Codon Usage Database“ für *Klebsiella pneumoniae* ASR1 der Datensatz von *Klebsiella pneumoniae* verwendet, da diese am engsten mit ASR1 verwandt ist. Aus den Referenztabelle wurden für jedes einzelne Codon die prozentualen  $w_{ij}$ -Werte errechnet. Diese sind in Tabelle 3 vergleichend dargestellt. Aus ihr geht hervor, dass selten von *Klebsiella pneumoniae* genutzte Codons UUA (27 %), UUG (27 %), CUC (27 %), CUA (13 %) das Stopcodon UAG (27 %), CGA (26 %), AGA (21 %) und AGG (16 %) sind. Damit unterscheidet sie sich von *Nicotiana tabacum*, der die Codons UCG (27 %), CCG (25 %), ACG (23 %), GCG (19 %), CGC (24 %) und CGG (24 %) seltener nutzt. *Hordeum vulgare* hat mit *Klebsiella pneumoniae* gemeinsam, dass sie kaum die Triplets UUA (12 %), CUA (26 %), CGA (24 %) und das Stopcodon UAG (23 %) verwendet.

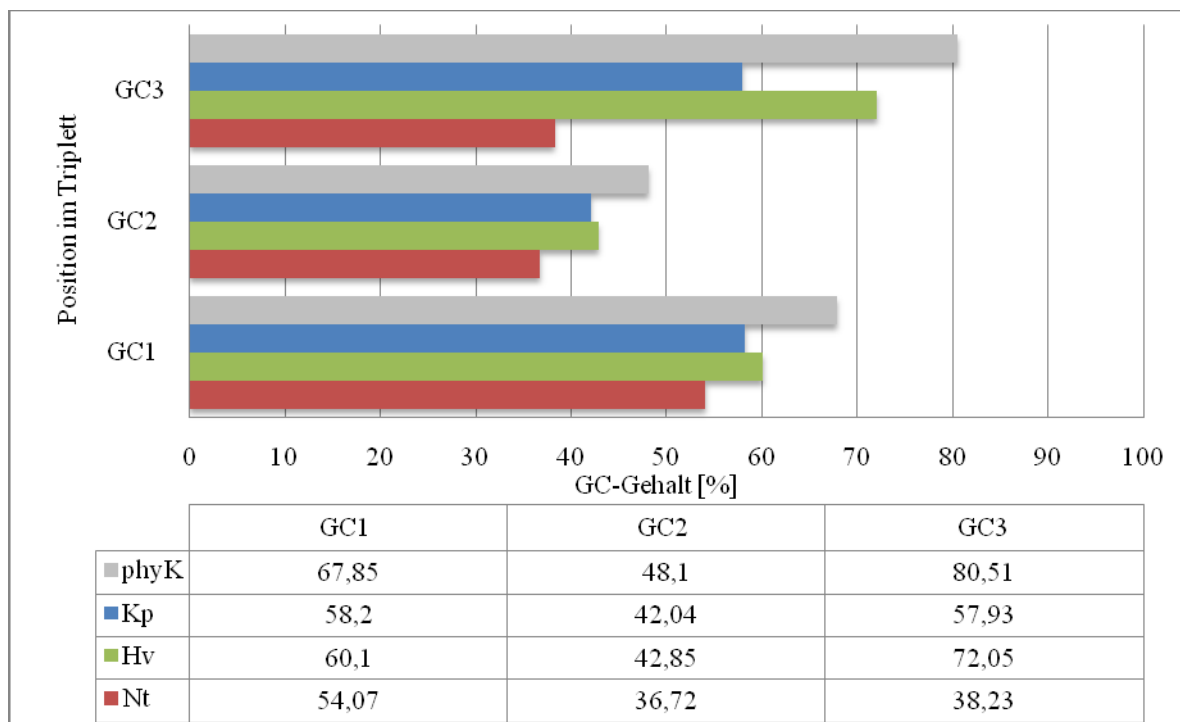
**Tabelle 3:** Codonnutzungsfrequenz aus der „Codon Usage Database“ und prozentuale relative Anpassungsfähigkeit  $w_{ij}$  für die Nutzung synonymen Codons von *Klebsiella pneumoniae* (K.P.) *Nicotiana tabacum* (N.T.) und *Hordeum vulgare* (H.V.). Die selten genutzten Codons sind für den jeweiligen Organismus grau markiert.

AS	CODON	FRAKTION K.P.	$W_{ij}$ [%] K.P.	FRAKTION CODONS N.T.	$W_{ij}$ [%] N.T.	FRAKTION H.V.	$W_{ij}$ [%] H.V.
F	UUU	0,58	100	0,58	100	0,28	39
F	UUC	0,42	72	0,42	72	0,72	100
L	UUA	0,12	27	0,15	58	0,04	12
L	UUG	0,12	27	0,24	92	0,12	35
L	CUU	0,14	31	0,26	100	0,16	47
L	CUC	0,12	27	0,13	50	0,34	100
L	CUA	0,06	13	0,1	38	0,09	26
L	CUG	0,45	100	0,11	42	0,25	74
I	AUU	0,42	100	0,5	100	0,26	44
I	AUC	0,42	100	0,25	50	0,59	100
I	AUA	0,16	38	0,25	50	0,15	25
M	AUG	1,00	100	1	100	1,00	100
V	GUU	0,25	76	0,41	100	0,21	57
V	GUC	0,25	76	0,17	41	0,32	86
V	GUA	0,16	48	0,17	41	0,10	27
V	GUG	0,33	100	0,25	61	0,37	100
S	UCU	0,12	41	0,26	100	0,14	54
S	UCC	0,16	55	0,13	50	0,24	92
S	UCA	0,14	48	0,23	88	0,13	50
S	UCG	0,15	52	0,07	27	0,13	50
P	CCU	0,18	38	0,37	93	0,19	66
P	CCC	0,18	38	0,13	33	0,29	100
P	CCA	0,18	38	0,4	100	0,24	83
P	CCG	0,47	100	0,1	25	0,28	97
T	ACU	0,16	37	0,39	100	0,17	43
T	ACC	0,43	100	0,19	49	0,40	100
T	ACA	0,17	40	0,34	87	0,20	50
T	ACG	0,24	56	0,09	23	0,24	60
A	GCU	0,17	47	0,43	100	0,21	55
A	GCC	0,36	100	0,17	40	0,38	100
A	GCA	0,18	50	0,32	74	0,16	42
A	GCG	0,30	83	0,08	19	0,26	68
Y	UAU	0,57	100	0,57	100	0,28	39
Y	UAC	0,43	75	0,43	75	0,72	100
Stop	UAA	0,55	100	0,42	100	0,14	20

AS	CODON	FRAKTION <i>K.P.</i>	$W_{IJ}$ [%] <i>K.P.</i>	FRAKTION CODONS <i>N.T.</i>	$W_{IJ}$ [%] <i>N.T.</i>	FRAKTION <i>H.V.</i>	$W_{IJ}$ [%] <i>H.V.</i>
Stop	UAG	0,15	27	0,19	45	0,16	23
H	CAU	0,55	100	0,61	100	0,35	54
H	CAC	0,45	82	0,39	64	0,65	100
Q	CAA	0,32	47	0,58	100	0,37	59
Q	CAG	0,68	100	0,42	72	0,63	100
N	AAU	0,51	100	0,61	100	0,31	45
N	AAC	0,49	96	0,39	64	0,69	100
K	AAA	0,64	100	0,49	96	0,20	25
K	AAG	0,36	56	0,51	100	0,80	100
D	GAU	0,59	100	0,69	100	0,41	69
D	GAC	0,41	69	0,31	45	0,59	100
E	GAA	0,56	100	0,55	100	0,27	37
E	GAG	0,44	79	0,45	82	0,73	100
C	UGU	0,38	61	0,58	100	0,32	47
C	UGC	0,62	100	0,42	72	0,68	100
Stop	UGA	0,29	53	0,39	93	0,69	100
W	UGG	1,00	100	1	100	1,00	100
R	CGU	0,21	55	0,15	45	0,10	40
R	CGC	0,38	100	0,08	24	0,25	100
R	CGA	0,10	26	0,11	33	0,06	24
R	CGG	0,17	45	0,08	24	0,23	92
S	AGU	0,14	48	0,17	65	0,10	38
S	AGC	0,29	100	0,13	50	0,26	100
R	AGA	0,08	21	0,33	100	0,11	44
R	AGG	0,06	16	0,25	76	0,25	100
G	GGU	0,24	59	0,33	97	0,22	52
G	GGC	0,41	100	0,17	50	0,42	100
G	GGA	0,16	39	0,34	100	0,17	40
G	GGG	0,18	44	0,16	47	0,19	45

Des Weiteren wurden die durchschnittlichen GC-Gehalte der drei Organismen miteinander verglichen. Sie betragen laut der „Codon Usage Database“ für *Klebsiella pneumoniae* 52,73 %, für *Nicotiana tabacum* ca. 43 % und für *Hordeum vulgare* 56,92 %. Bei der Gegenüberstellung der GC-Gehalte von *phyK*, *Klebsiella pneumoniae*, *Nicotiana tabacum* und *Hordeum vulgare* zeigt sich, dass diese besonders in der dritten Position voneinander abweichen (Abbildung 15). Die eudikotyle Pflanze *Nicotiana tabacum* hat mit 38,23 % den niedrigsten durchschnittlichen GC-Gehalt an der Position 3 im Triplet. *Klebsiella*

*pneumoniae* und *Hordeum vulgare* unterscheiden sich in den Positionen 1 und 2 kaum. Nur an der Position 3 ist der GC-Gehalt von *Hordeum vulgare* um 14 % höher. Das Phytasegen *phyK* hat mit 65,7 % einen sehr hohen durchschnittlichen GC-Gehalt. Besonders die erste Position mit 67,85 % und die dritte Position mit 80,51 % sind sehr GC-reich. Die GC-Werte des *phyK* Gens entsprechen in der Tendenz eher denen von *Hordeum vulgare* Genen mit hohem Transkriptionslevel mit 60,10 % an Position 1, 42,85 % an Position 2 und 72,01 % an der dritten Position (Wang and Roossinck 2006).

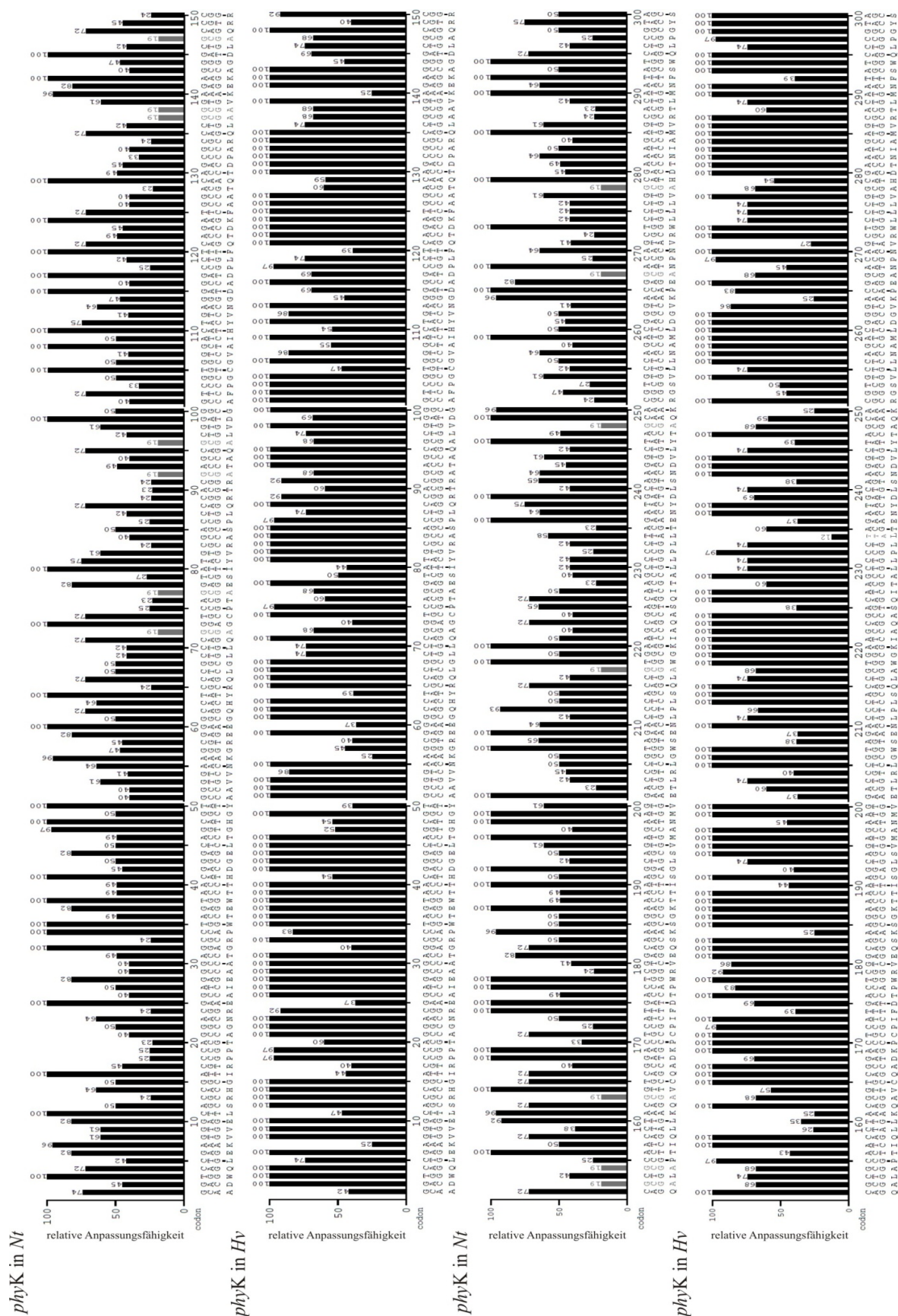


**Abbildung 15:** Vergleich des durchschnittlichen GC-Gehalts der Positionen 1, 2 und 3 (GC1, GC2, GC3) im Triplet bei *phyK* aus *Klebsiella pneumoniae* ASR1 (*phyK*, grau), *Klebsiella pneumoniae* (*Kp*, blau), *Nicotiana tabacum* (*Nt*, braun) und *Hordeum vulgare* (*Hv*, grün).

Auch für *phyK* ohne Signalsequenz wurde die relative Anpassungsfähigkeit der Triplets mit dem Programm GCUA Version 2.0 (Fuhrmann, Hausherr et al. 2004) gegen den jeweiligen Wirtsorganismus abgeglichen (Abbildung 16). Die Codon-Präferenz von *phyK* unterscheidet sich von der der beiden Wirtsorganismen unterschiedlich stark. Die Sequenz von *phyK* enthält 68 für *Nicotiana tabacum* seltene Codons. Darunter befindet sich 20mal das Codon GCG, welches mit 19 % den für *Nicotiana tabacum* niedrigsten  $w_{ij}$ -Wert besitzt. Es tritt ab der Position 72 auf und ist über den gesamten Rest der Sequenz mit gelegentlichen Dopplungen verteilt. Für *Hordeum vulgare* befinden sich in der Gensequenz von *phyK* nur 12 seltene Triplets. Darunter 7mal das für die Aminosäure Lysin kodierende Triplet AAA, 1mal UUA, 1mal CUA und 2mal das für Valin kodierende Triplet



GUA. Das Codon UUA ist das mit dem für *Hordeum vulgare* niedrigsten  $w_{ij}$ -Wert von 12 %. Es ist an der Position 234 zu finden.



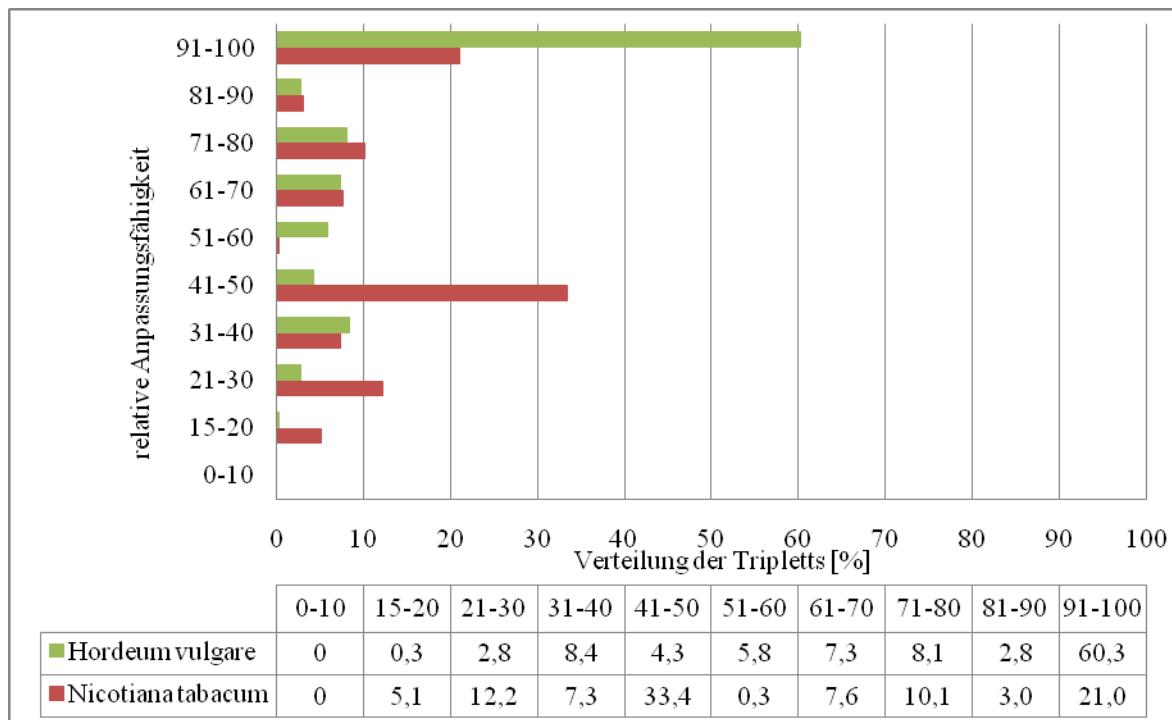




**Abbildung 16:** Mit dem Programm GCUA Version 2.0 berechnete relative Anpassungsfähigkeit von *Nicotiana tabacum* (Nt) und *Hordeum vulgare* (Hv) bei der Expression von *phyK* aus *Klebsiella pneumoniae* ASR1. Die y-Achse zeigt die relative Anpassungsfähigkeit in [%]. Hierbei ist für jede Aminosäure das Triplet mit der größten Nutzungshäufigkeit 100 % gesetzt worden, die weiteren synonymen Triplets sind in ihrer Häufigkeit prozentual dazu dargestellt. Die x-Achse zeigt die DNA-Sequenz in Triplets und die jeweilige Aminosäure im 1 Buchstabenkode. Alle Codons deren relative Anpassungshäufigkeit 20 % unterschreitet sind grau und unter 15 % rot dargestellt.

Teilt man die Triplets entsprechend der Codon-Präferenz von *Nicotiana tabacum* bzw. *Hordeum vulgare* in Gruppen ein zeigt sich, dass der Anteil der wenig verwendeten Codons für *phyK* in *Nicotiana tabacum* 17,3 % und für *Hordeum vulgare* nur 3,1 % beträgt

(Abbildung 17). Die Menge an für *Nicotiana tabacum* optimalen Codons ist mit 21,0 % eher gering. Das Phytasegen *phyK* ist mit 60,3 % an optimalen Codons besser an die Codon-Präferenz von *Hordeum vulgare* angepasst als an *Nicotiana tabacum*.



**Abbildung 17:** Prozentuale Verteilung der Triplets von *phyK* in Abhängigkeit von der Codon-Präferenz von *Nicotiana tabacum* (braun) bzw. *Hordeum vulgare* (grün).

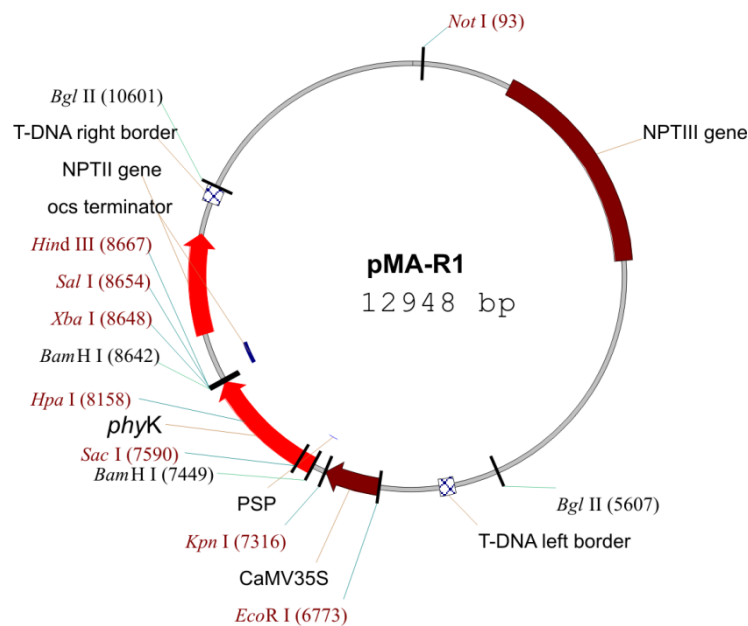
Berechnet man den CAI für *phyK* in *Klebsiella pneumoniae* ergibt sich ein Wert von 0,82. Für *phyK* in *Nicotiana tabacum* beträgt der CAI 0,58 und für *Hordeum vulgare* 0,83. Es wurde daher auf eine Codonoptimierung im Rahmen einer Genneusynthese verzichtet.

### 2.1.2.2 Expression des Phytasegens *phyK* in *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun

#### 2.1.2.2.1 Klonierungsstrategie für die Expression von *phyK* in *Nicotiana tabacum* L. cv.

##### Samsun

Das Phytasegen *phyK* wurde aus chromosomaler DNA des Stammes *Klebsiella pneumoniae* ASR1 mit den Primern RS1 und RS2 amplifiziert. Das Fragment wurde mit *Bam*HI verdaut und über den *Bam*HII-Schnittort in den binären Vektor pMA hinter den CaMV35S-Promotor und die Signalsequenz des Proteinaseinhibitors II aus *Solanum tuberosum* ligiert. Das Konstrukt wurde mit dem Namen pMA-R1 bezeichnet (Abbildung 18). Es wurde sequenziert und in den nicht tumorinduzierenden *Agrobacterium tumefaciens* Stamm pGV2260 transformiert. Der daraus resultierende Stamm erhielt die Bezeichnung pGV2260-pMA-R1.

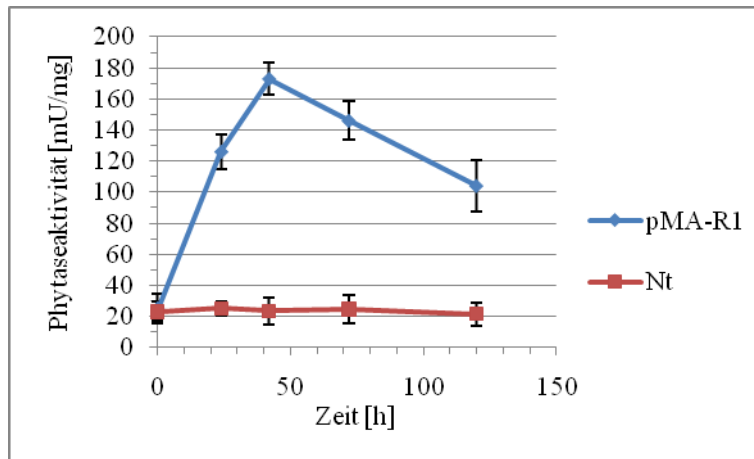


**Abbildung 18:** Konstrukt pMA-R1 zur Transformation in *Nicotiana tabacum* mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. Das Phytasegen *phyK* befindet sich unter der Kontrolle des CaMV35S –Promotors, ist mit dem Signalpeptid des Proteinaseinhibitors II (PSP) aus *Solanum tuberosum* fusioniert und wird durch den ocs-Terminator terminiert.

#### 2.1.2.2.2 Transformation und Expressionskontrolle von *phyK*

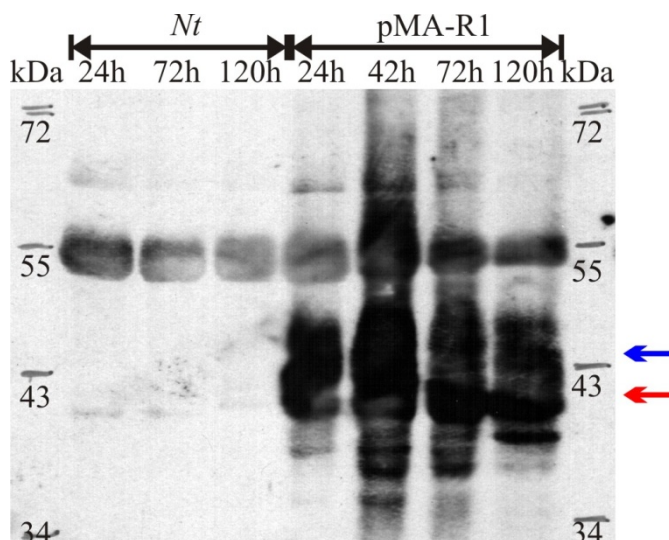
##### 2.1.2.2.2.1 Expressionskontrolle durch transiente Expression von *phyK*

Aufgrund des hohen GC-Gehaltes des Phytasegens, wurde die Exprimierbarkeit der im Vektor pMA-R1 befindlichen Kassette mit Hilfe der Methode der transienten Expression von intakten *Nicotiana tabacum* Blättern mit dem Stamm pV2260-pMA-R1 überprüft. Daraufhin wurden die Phytaseaktivitäten in den mit *Agrobacterium tumefaciens* pGV2260 infiltrierten Blättern 24 h, 42 h, 72 h und 120 h nach der Infiltration gemessen. Als Kontrolle wurden *Nicotiana tabacum* Blätter mit Infiltrationspuffer versetzt. Die Phytaseaktivitäten mit dem Standardaktivitätstest bei pH 5 bestimmt, stiegen im Verlauf der Expressionsdauer erst schnell an und fielen schließlich langsam wieder ab (Abbildung 19). Die Phytaseaktivität erreichte 24 h nach der Transformation 126 mU/ mg und nach 42 h ihren Höhepunkt mit 173 mU/ mg. Sie sank nach 72 h auf 146 mU/ mg und betrug nach 120 h noch 104 mU/ mg. Die Kontrolle zeigte eine leichte Hintergrundaktivität um ca. 24 mU/ mg.



**Abbildung 19:** *Agrobacterium*-vermittelte transiente Expression der Expressionskassette von pMA-R1 in *Nicotiana tabacum* Blättern. Es sind die Phytaseaktivitäten des expremierten *phyK*-Gens (pMA-R1, blau) und als Kontrolle mit dem Puffer infiltrierte *Nicotiana tabacum* Blätter (Nt, braun) dargestellt.

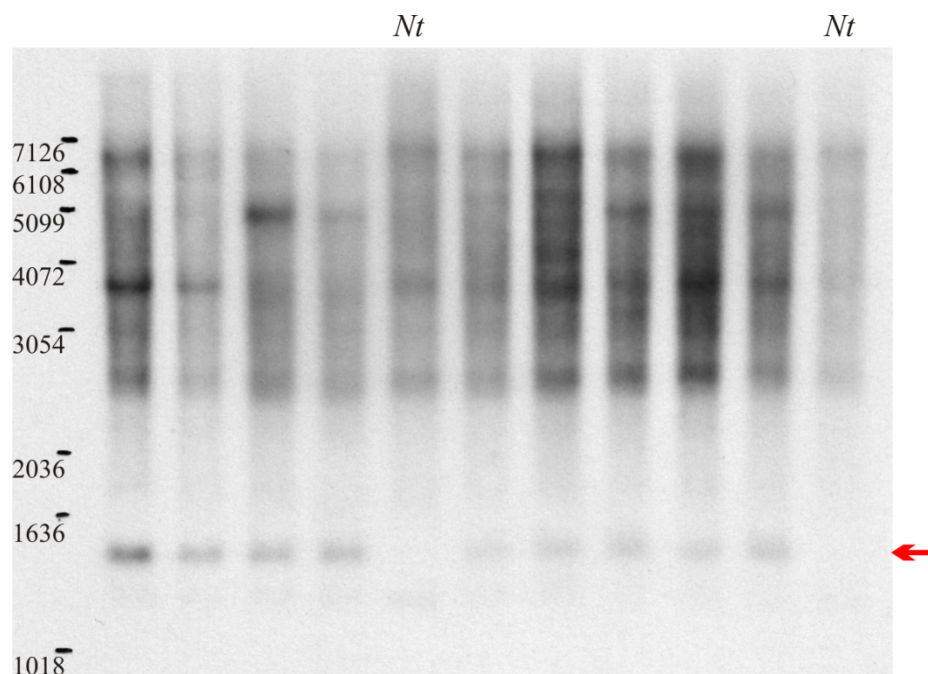
Die für den Phytaseaktivitätstest verwendeten Proben der transienten Expression wurden mittels der Westernblot-Technik auf das Vorhandensein der PhyK analysiert. Das Phytaseprotein war in den Proben schon nach 24 h nachweisbar (Abbildung 20). Nach 42 h zeigte die Proteinbande die größte Intensität und damit die höchste Proteinmenge an PhyK. Nach 72 h und 120 h schwächte sich die obere Proteinbande ab, die untere Bande blieb in ihrer Intensität annähernd konstant. Bei den übrigen Banden könnte es sich um Abbauprodukte des Phytaseproteins handeln. Die Kontrollproben des Wildtyps zeigten nur eine Kreuzreaktion mit dem Rubisco-Komplex, der ein Molekulargewicht von ca. 53 kDa im Westernblot aufweist, jedoch keine Phytasebanden.



**Abbildung 20:** Westernblot-Analyse der transienten Expression des Konstruktes pMA-R1 in *Nicotiana tabacum*. Nach der Infiltration von Blättern mit *Agrobacterium tumefaciens* pGV2260-pMA-R1 sind zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und untersucht worden. Die obere Phytasebande ist mit einem blauen Pfeil und die untere mit einem roten Pfeil markiert. Als Kontrolle sind mit Puffer infiltrierte Blätter des Wildtyps (*Nt*) verwendet worden.

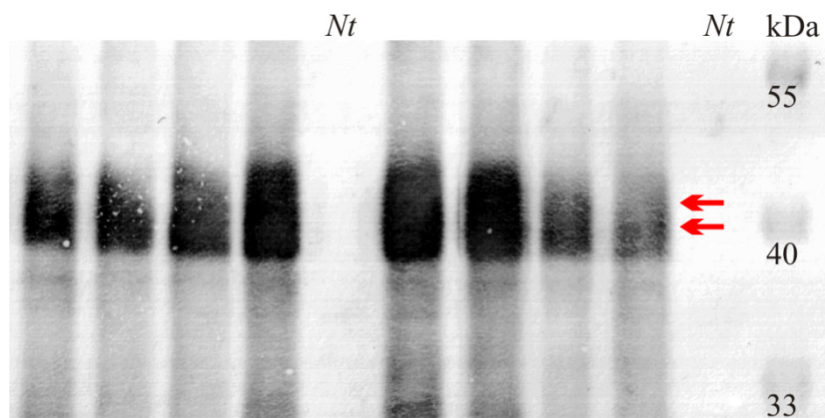
2.1.2.2.2 Stabile Integration von *phyK* in das Genom von *Nicotiana tabacum* L. cv Samsun

Die Expressionskassette pMA-R1 wurde mit Hilfe von pV2260-pMA-R1 stabil in die chromosomale DNA von *Nicotiana tabacum* integriert. Aus dem transformierten Blattmaterial wurden ca. 80 Pflanzen regeneriert und mit einer  $P^{32}$ -markierten Sonde mit Hilfe der Southernblot-Technik gescreent. In der Erkennungssequenz für die Phytasesonde liegt ein *HpaI*-Schnittort, weshalb pro Integrationsort zwei Fragmente entstanden. Das eine Fragment hatte eine Größe von 1385 bp, die Größe des anderen Fragments schwankte je nach Integrationsort. Aus dem Beispiel in Abbildung 21 ist erkennbar, dass alle im Blot gezeigten Linien das Fragment von 1385 b aufwiesen. Damit trugen alle diese Linien *phyK* in mindestens einfacher Kopie in ihrem Genom.



**Abbildung 21:** Nachweis der Insertion des Phytasegens *phyK* in das Genom von *Nicotiana tabacum* mit Hilfe der Southernblotanalyse. Der rote Pfeil kennzeichnet die von der Sonde nachgewiesenen Fragmente. Als Kontrolle ist mit *EcoRI* verdaute genomische DNA des Wildtyps (*Nt*) mitgeführt worden.

Die Linien wurden zusätzlich mit Hilfe der Westernblot-Technik mit einem für PhyK spezifischen polyklonalen Antikörper analysiert. Ein Screeningbeispiel wurde in Abbildung 22 dargestellt. Die Phytasebande läuft auf Höhe der 40 kDa-Marke. Außer dem Wildtyp zeigen alle Linien eine Expression. Die Expressionsstärke zwischen den einzelnen Linien schwankt.



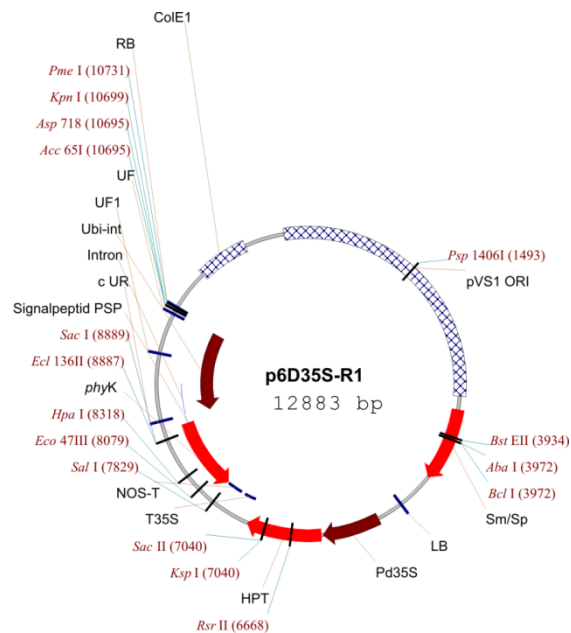
**Abbildung 22:** Westernblot-Analyse von Blättern der mit pGV2260-pMA-R1 transformierten *Nicotiana tabacum* Linien. Die roten Pfeile markieren die Phytasebanden. Als Kontrolle ist Gesamtprotein aus dem Blatt von *Nicotiana tabacum* (Nt) aufgetragen worden.

### 2.1.2.3 Expression von *phyK* in *Hordeum vulgare* L. Golden Promise. cv

#### 2.1.2.3.1 Klonierungsstrategie für die Expression von *phyK* in *Hordeum vulgare* L. cv. Golden Promise

Das Phytasegen *phyK* mit dem Signalpeptid des Proteinaseinhibitors II aus *Solanum tuberosum* wurde aus dem Konstrukt pMA-R1 mit den Primern 5'PSP45copBglII und 3'R1SalI amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen *BglII* und *SalI* verdaut und über die Schnittorte *BamHI* und *SalI* in das Plasmid UBIP-ABM hinter den Ubiquitinpromotor und vor den nos-Terminator ligiert. Das Konstrukt wurde mit dem Namen UBIP-ABM-R1 bezeichnet. Aus dem Plasmid UBIP-ABM-R1 wurde mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *SfiI* die gesamte Kassette mit Ubiquitinpromotor, Signalpeptid, *phyK* und nos-Terminator ausgeschnitten und über den *SfiI*-Schnittort in den Vektor p6D35S eingefügt. Das Konstrukt wurde mit dem Namen p6D35S-R1 bezeichnet (Abbildung 23). Das Konstrukt wurde sequenziert und in den nicht Tumor-induzierenden *Agrobacterium tumefaciens* Stamm AGL1 transformiert. Der daraus resultierende Stamm wurde als AGL1-R1 bezeichnet.





**Abbildung 23 :** Das Konstrukt p6D35S-R1 zur Transformation von *Hordeum vulgare* mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* AGL1. Das Gen *phyK* aus *Klebsiella pneumoniae* ASR1 befindet sich zwischen dem Signalpeptid des Proteinaseinhibitors II (PSP) aus *Solanum tuberosum* und dem nos-Terminator (NOS-T) unter der Kontrolle des Ubiquitinpromotors (Ubi-int).

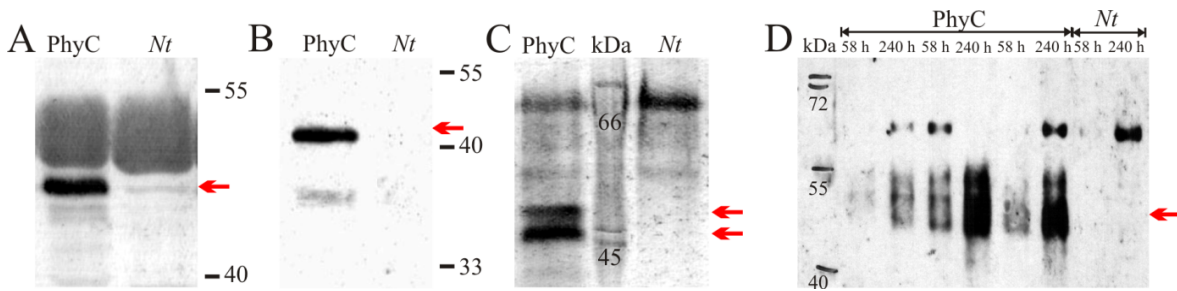
#### 2.1.2.3.2 Transformation von p6D35S-R1 und Selektion der transgenen *Hordeum vulgare* Pflanzen

Die Expressionskassette aus p6D35S-R1 wurde durch *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 auf unreife Embryos von *Hordeum vulgare* übertragen. Für das Konstrukt mit *phyK* wurden ca. 100 vollständige Pflanzen regeneriert. Der Nachweis der Integration der Expressionskassette wurde mittels PCR erbracht. Die PCR-positiven Pflanzen wurden durch eine Westernblot-Analyse mit für die Phytase spezifischen Antikörpern getestet. Die Pflanzen, die eine Expression von *phyK* zeigten, wurden weiter untersucht.

### 2.1.3 Nachweis der heterolog exprimierten Proteine in *Nicotiana tabacum*

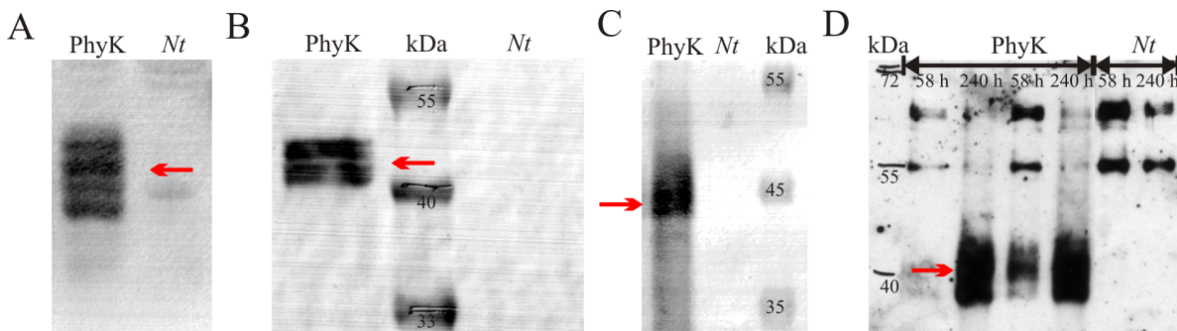
#### 2.1.3.1 Nachweis von PhyC und PhyK in verschiedenen Geweben von *Nicotiana tabacum*

Da sich die Phytasegene unter Kontrolle des 35S-CaMV Promotors befinden, werden sie konstitutiv in allen Geweben exprimiert (Odell, Nagy et al. 1985). Die Expression von *phyC* ist in verschiedenen Geweben der Pflanze nachweisbar (Abbildung 24). Das Protein ist im Blatt (A), im extrazellulären Raum (B), in der Wurzel (C) und in der Nährlösung (D) vorhanden. In der Nährlösung ist nach 58 h eine schwache Phytase-Bande ersichtlich, die sich nach 240 h verstärkt. Die als Kontrolle mitgeführten *Nicotiana tabacum* Pflanzen zeigen keine Phytasesekretion.



**Abbildung 24:** Westernblot-Analyse von Blatt (A), extrazellulärer Flüssigkeit (B), Wurzel (C) und Nährlösung (D) von transgenen *Nicotiana tabacum* Linien. A) 20 µg Totalproteinextrakt vom Blatt. Als Kontrolle wurde die gleiche Proteinmenge aus *Nicotiana tabacum* Wildtyp (*Nt*) vom Blatt aufgetragen. B) Extrazelluläre Flüssigkeit gewonnen nach (Verwoerd, van Paridon et al. 1995). Als Kontrolle hat extrazelluläre Flüssigkeit des Wildtyps (*Nt*) gedient. C) Totalproteinextrakt aus der Wurzel. Als Kontrolle wurde Wurzelmaterial des Wildtyps (*Nt*) verwendet. D) Nährlösung. Die Probennahme ist nach 58 h bzw. 240 h bei Transgenen (PhyC) und Wildtyppflanzen (*Nt*) erfolgt. Die roten Pfeile markieren die Phytasebanden.

Genauso wie PhyC ist PhyK sowohl im Blatt (A), im extrazellulären Raum (B) in der Wurzel (C) als auch in der Nährlösung (D) vorhanden (Abbildung 25). Nach 58 h erscheint eine schwache Phytasebande, die sich im Laufe von 240 h in der Nährlösung verstärkt.

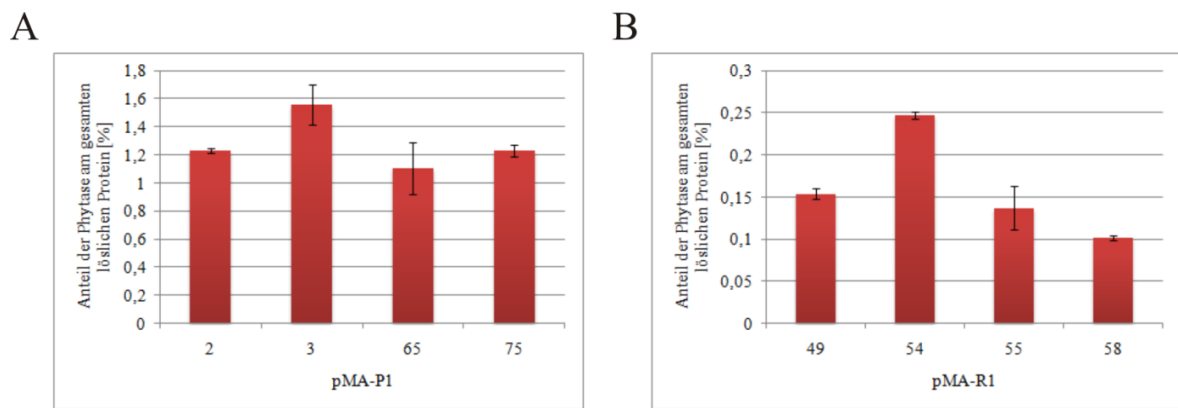


**Abbildung 25:** Westernblot-Analyse von Blatt (A), extrazellulärer Flüssigkeit (B), Wurzel (C) und Nährlösung (D) von transgenen *Nicotiana tabacum* Linien. A) 20 µg Totalproteinextrakt. Als Kontrolle wurde die gleiche Proteinmenge aus *Nicotiana tabacum* Wildtyp (*Nt*) vom Blatt aufgetragen. B) Extrazelluläre Flüssigkeit gewonnen nach (Verwoerd, van Paridon et al. 1995). Als Kontrolle diente extrazelluläre Flüssigkeit des Wildtyps (*Nt*). C) Totalproteinextrakt. Als Kontrolle wurde Wurzelmaterial des Wildtyps (*Nt*) verwendet. D) Nährlösung. Die Probennahme ist nach 58 h bzw. 240 h bei Transgenen (PhyK) und Wildtyppflanzen (*Nt*) erfolgt. Die roten Pfeile markieren die Phytasebanden.

### 2.1.3.2 Anteil der rekombinanten Proteine am gesamten löslichen Protein von *Nicotiana tabacum*

Der prozentuale Anteil der rekombinanten Phytaseproteine am gesamten löslichen Protein in den Blättern der T<sub>1</sub>-Generation von *Nicotiana tabacum* wurde, wie in (Chan, Lung et al. 2006) beschrieben, berechnet. Der Anteil am gesamten löslichen Protein von PhyC schwankt zwischen 1,1 % und 1,6 % und für PhyK zwischen 0,1 % und 0,25 % (Abbildung 26). In der T<sub>2</sub>-Generation liegt er bei 1,45 % für PhyC und bei 0,15 % für PhyK.

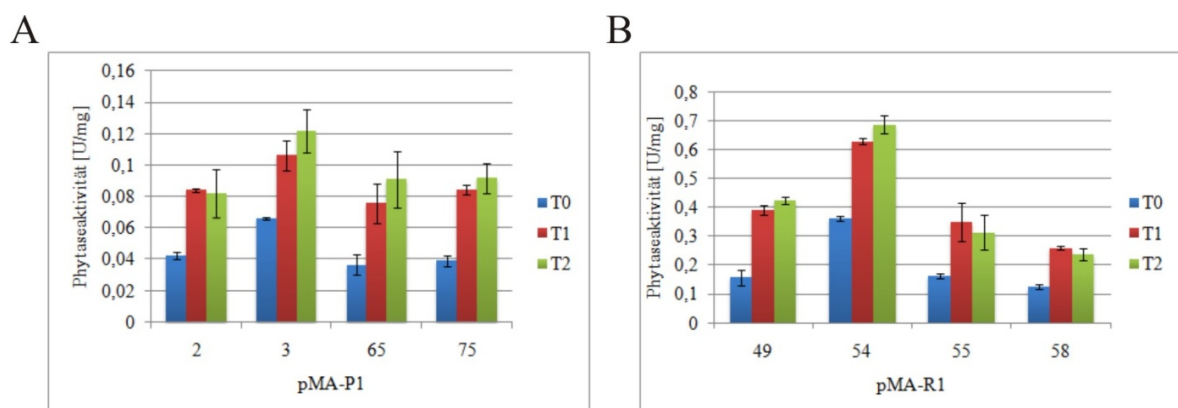




**Abbildung 26:** Vergleich des prozentualen Anteils des Phytaseproteins A) PhyC (pMA-P1) und B) PhyK (pMA-R1) am gesamten löslichen Protein im Blatt der Expressionslinien der T<sub>1</sub>-Generation von *Nicotiana tabacum*.

### 2.1.3.3 Phytaseaktivitäten von PhyC und PhyK in den Blättern von *Nicotiana tabacum*

Da beide Gene unter der Kontrolle des konstitutiven 35S CaMV-Promotors stehen, wurden die Phytaseaktivitäten in den Blättern von 35 Tage alten Pflanzen bestimmt (Abbildung 27). Die leichte Hintergrundaktivität des Wildtyps wurde von der Aktivität der transgenen Linien abgezogen. Die ausgesuchten Expressionslinien von *phyC* zeigten in der T<sub>0</sub>-Generation Phytaseaktivitäten zwischen 36 und 66 mU/mg. In der T<sub>1</sub>-Generation hatten sich die Aktivitäten nahezu auf 75 bis 106 mU/mg verdoppelt. In der T<sub>2</sub>-Generation blieben die Phytaseaktivitäten im Vergleich zur T<sub>1</sub>-Generation annähernd konstant. Die Expressionslinien von *phyK* zeigten in der T<sub>0</sub>-Generation eine Phytaseaktivität zwischen 126 und 362 mU/mg. In der T<sub>1</sub>-Generation waren die Werte mit 259 bis 628 mU/mg fast verdoppelt. In der T<sub>2</sub>-Generation blieben die Aktivitäten dann im Vergleich zur T<sub>1</sub>-Generation mit 236 bis 686 mU/mg nahezu konstant.



**Abbildung 27:** Phytaseaktivitäten von A) PhyC (pMA-P1) und B) PhyK (pMA-R1) im Blatt von 35 Tage alten *Nicotiana tabacum* Pflanzen über mehrere Generationen.

#### 2.1.3.4 Phytaseaktivität im extrazellulären Raum

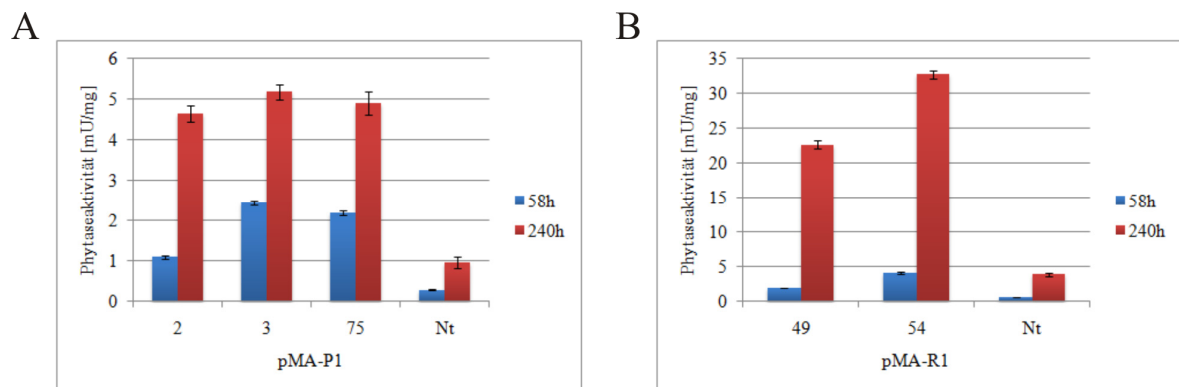
Es wurde die extrazelluläre Flüssigkeit von Blättern der T<sub>1</sub>-Generation ähnlich der Methode von (Verwoerd, van Paridon et al. 1995) isoliert und auf Phytaseaktivität von PhyC und PhyK untersucht. Mit Hilfe des Quotienten, aus den in der extrazellulären Flüssigkeit und den im Gesamtproteinextrakt gemessenen Phytaseaktivitäten, ließ sich ermitteln, ob die Phytase in den extrazellulären Raum sekretiert wurde (Verwoerd, van Paridon et al. 1995). Tabelle 4 stellt die Phytaseaktivitäten in der extrazellulären Flüssigkeit und im Gesamtproteinextrakt dar. Für PhyC schwanken die Phytaseaktivitäten in Abhängigkeit von der Expressionslinie in der extrazellulären Flüssigkeit zwischen 1,42 und 1,76 U/mg und sind damit bis zu 69mal höher als im Gesamtproteinextrakt. Die Phytaseaktivitäten von PhyK betragen zwischen ca. 4 und 5 U/mg im extrazellulären Extrakt und sind damit zwischen 36 und 52mal höher als die Phytaseaktivitäten im Gesamtproteinextrakt.

**Tabelle 4:** Nachweis von PhyC und PhyK im extrazellulären Raum von *Nicotiana tabacum* Blättern.

GENOTYP	SPEZIFISCHE AKTIVITÄT EXTRAZELLULÄRE FLÜSSIGKEIT (EF) [U/MG]	SPEZIFISCHE AKTIVITÄT GESAMTPROTEINEXTRAKT (GPE) [U/MG]	QUOTIENT DER PHYTASEAKTIVITÄTEN EF/GPE
pMA-P1 2	1,50 ± 0,044	0,059 ± 0,001	25,49
pMA-P1 3	1,76 ± 0,050	0,0395 ± 0,006	44,56
pMA-P1 38/5	1,42 ± 0,038	0,023 ± 0,003	61,74
pMA-P1 65/2	1,52 ± 0,077	0,025 ± 0,013	60,80
pMA-P1 75/2	1,66 ± 0,099	0,024 ± 0,011	69,17
pMA-R1 49/1	5,32 ± 0,64	0,104 ± 0,012	51,17
pMA-R1 49/3	4,01 ± 0,56	0,110 ± 0,009	36,52
pMA-R1 49/5	4,39 ± 0,93	0,0836 ± 0,010	52,51

#### 2.1.3.5 Phytaseaktivitäten in den Wurzelexudaten

Die Akkumulation der rekombinanten Phytasen war nicht nur mit spezifischen Antikörpern in den Wurzelexudaten nachweisbar, sondern auch durch den Phytaseaktivitätstest. Die transgenen Linien pMA-P1 zeigten nach 240 h eine fünffache Erhöhung der Phytaseaktivitäten im Gegensatz zum Wildtyp. Die transgenen Linien pMA-R1 wiesen eine bis zu 8mal höhere Phytaseaktivität als der Wildtyp auf.



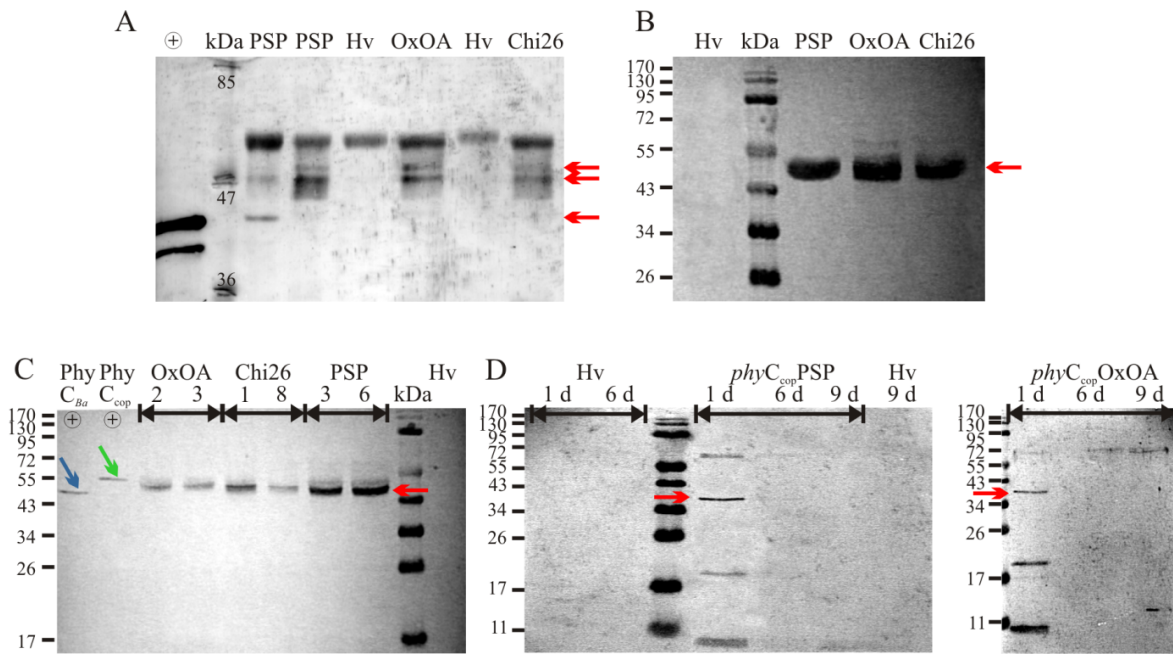
**Abbildung 28:** Phytaseaktivitäten in den Wurzelexudaten der T<sub>1</sub>-Generation von *Nicotiana tabacum*. Die Diagramme zeigen die spezifischen Phytaseaktivitäten im Verlauf der Wurzelsekretion bis zu 240 h.

#### 2.1.4 Nachweis von PhyC und PhyK in *Hordeum vulgare* L. cv. Golden Promise

Da sich sowohl *phyC*<sub>cop</sub> als auch *phyK* unter Kontrolle des konstitutiven Ubiquitin-Promotors aus Mais befinden, ist ihre Expression in allen Geweben der Pflanze anzunehmen. Da sowohl das Signalpeptid des Proteinaseinhibitors II (PSP) als auch das Signalpeptid von *OxOA* sekretorisch sind (Borisjuk, Borisjuk et al. 1999; Wu, Druka et al. 2000), ist eine eventuelle Sekretion der Proteine durch die Wurzel in das umgebende Medium zu erwarten. Das Signalpeptid des Endochitinasegens *chi26* sorgt möglicherweise für den Transport von PhyC aus dem Cytosol in das Aleurongewebe der Samen. Zur Kontrolle der Expression wurden Westernblot-Analysen von Blatt, Wurzel, Samen und Nährlösung der Konstrukte p6D35S-PSP/*OxOA*/*Chi26* angefertigt (Abbildung 29). Die Phytase ist im Blatt (A), in der Wurzel (B), in den Samen (C) und in der Nährlösung (D) nachweisbar. Bei allen Konstrukten zeigten sich in der Analyse des Blattmaterials mindestens zwei Banden unterschiedlicher Größe, die sich von dem als Positiv-Kontrolle aufgetragenen nativen PhyC unterschieden. Bei dem Konstrukt mit dem PSP-Signalpeptid waren drei Banden im Blot sichtbar. Eine entspricht dabei in ihrer Größe der der Positiv-Kontrolle. In der Wurzelanalyse ist bei allen Konstrukten eine Expression nachweisbar. Das Phytaseprotein ist auch hier deutlich größer als, die für die native Phytase im SDS-Gel bestimmte Größe von 41,1 kDa.

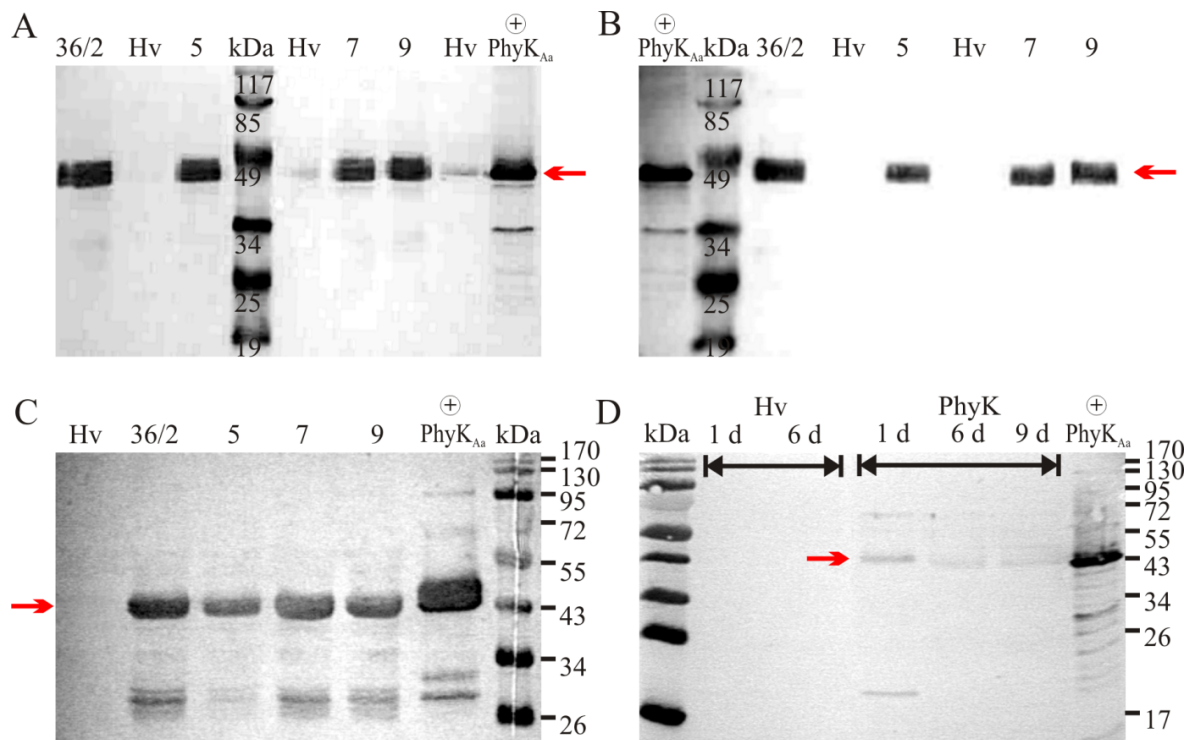
In der Nährlösung war nach einem Tag bei beiden sekretorischen Signalpeptiden eine schwache Phytase-Bande erkennbar, die aber nach 6 bzw. 9 Tagen nicht mehr nachweisbar war (Abbildung 29 D). Die in allen Westernblots mitgeführten Proben von *Hordeum vulgare* Pflanzen zeigten in keiner der Analysen eine Phytasebande.

Die Analyse der Samen zeigt, dass bei allen Konstrukten auch hier eine Expression und Akkumulation der Phytase stattgefunden hat (Abbildung 29 C). Im Vergleich der unterschiedlichen Konstrukte zeigten die Samen der Pflanzen mit dem Proteinaseinhibitor II Signalpeptid (PSP) die stärkste Bande. Bei Vergleich der Massen zeigte sich, dass die Proteinbande bei PSP kleiner ist als bei OxOA und Chi26.



**Abbildung 29:** Westernblot-Analyse von A) Blatt, B) Wurzel, C) Samen und D) Nährlösung von *Hordeum vulgare* cv. Golden Promise p6D35S-PSP/OxOA/Chi26. Die verschiedenen Konstrukte sind mit PSP, Chi26 und OxOA bezeichnet. Für A) und B) wurden 20 µg Gesamtprotein aufgetragen. Für C) wurden 30 µg Gesamtprotein und für D) wurden 1 ml durch TCA-Fällung eingengt und aufgetragen. Als Kontrollen wurden auf gleiche Weise präparierte Proben vom Wildtyp (Hv) aufgetragen. Die roten Pfeile markieren die Phytasebande in den verschiedenen Geweben, der grüne und der blaue Pfeil markieren die als Kontrolle aufgetragenen aufgereinigten PhyC-Proteine aus *Hordeum vulgare* Blattmaterial (PhyC<sub>cop</sub>) und *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 (PhyC<sub>Ba</sub>).

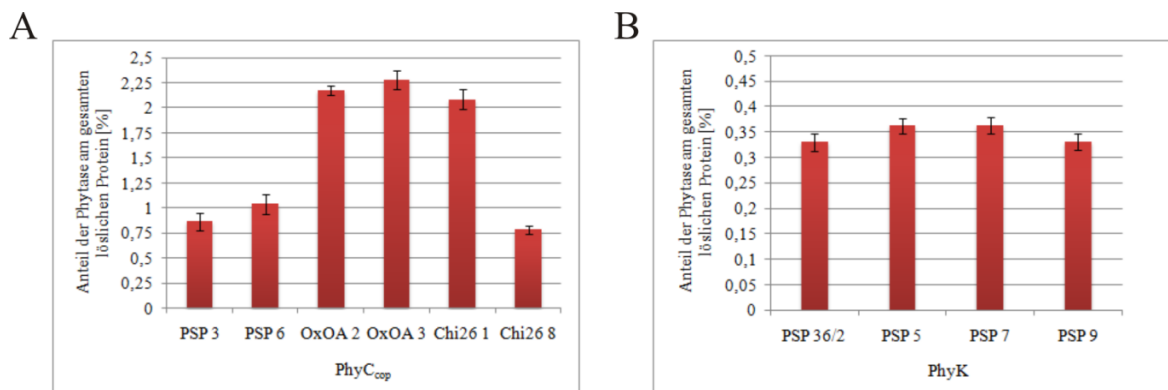
Für das Konstrukt mit PSP-Signalpeptid und *phyK* wurden ebenso im Westernblot analysiert -Blatt, Wurzel, Samen und Nährlösung. Die Phytase ist sowohl im Blatt, der Wurzel, den Samen als auch in der Nährlösung nachweisbar (Abbildung 30). Die Analyse des Blatts, der Wurzel und der Samen zeigte, dass in diesen Geweben sowohl eine Expression als auch eine Akkumulation stattfand. Die Phytasebande aus Blatt, Wurzel, Samen und Nährlösung läuft auf derselben Höhe bei ca. 42 kDa wie die als Positiv-Kontrolle aufgetragene aus *Arxula adenivorans* gereinigte PhyK und entspricht damit in ihrer Größe der nativen Phytase aus *Klebsiella pneumoniae* ASR1 (Herter 2009). In der Nährlösung trat nach einem Tag eine Phytase-Bande auf, die nach 6 Tagen deutlich nachließ und nach 9 Tagen nur noch schwach nachweisbar war. Für den Wildtyp von *Hordeum vulgare* war in keiner der Analysen eine Phytasebande nachweisbar.



**Abbildung 30:** Westernblot-Analyse der transgenen *Hordeum vulgare* cv. Golden Promise p6D35S-R1 Linien von A) Blatt, B) Wurzel, C) Samen und D) der Nährlösung. Für A) und B) wurden 20 µg Gesamtprotein aufgetragen. Für C) wurden 30 µg Gesamtprotein und für D) wurde 1 ml durch TCA-Fällung eingengt und aufgetragen. Als Kontrollen wurden auf gleiche Weise präparierte Proben vom Wildtyp (Hv) und als Positiv-Kontrolle das PhyK-Protein aus *Arxula adeninivorans* (PhyK<sub>Aa</sub>) aufgereinigt, eingesetzt. Die roten Pfeile markieren die Phytasebande.

#### 2.1.4.1 Anteil der rekombinanten Proteine am gesamten löslichen Protein von *Hordeum vulgare* L. cv. Golden Promise

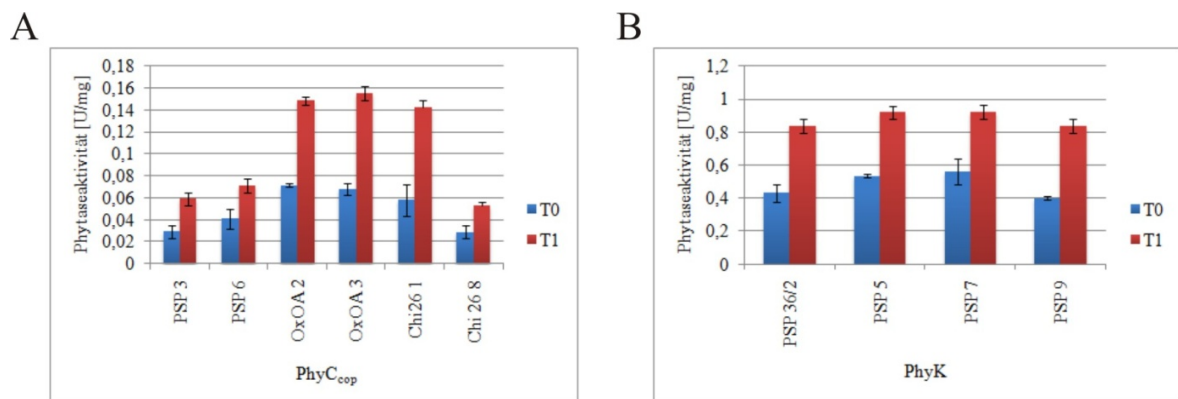
Der Anteil am gesamten löslichen Protein der rekombinanten Phytaseproteine in *Hordeum vulgare* Blättern der T<sub>1</sub>-Generation ist in Abbildung 31 dargestellt. Er schwankte zwischen 0,9 % und 1,0 % für das Konstrukt PhyC<sub>cop</sub> mit dem Proteinaseinhibitor II Signalpeptid (PSP). In der T<sub>2</sub>-Generation lag er bei 1,39 %. Für das Konstrukt mit dem Signalpeptid der Oxalatoxidase A (OxOA) betrug er 2,2 und 2,3 %. Das PhyC<sub>cop</sub> mit dem Signalpeptid der Endochitinase 26 (Chi26) zeigte starke Schwankungen mit einem Anteil zwischen 2,1 % und 0,8 %. Für PhyK ergab sich ein Anteil zwischen 0,33 und 0,36 % in der T<sub>1</sub>-Generation. In der T<sub>2</sub>-Generation lag dieser bei 0,34 %.



**Abbildung 31:** Vergleich des prozentualen Anteils des Phytaseproteins A) PhyC<sub>cop</sub> und B) PhyK am gesamten löslichen Protein im Blatt der Expressionslinien der T<sub>1</sub>-Generation von *Hordeum vulgare* L. cv. Golden Promise.

#### 2.1.4.2 Phytaseaktivitäten von PhyC und PhyK in den Blättern von *Hordeum vulgare* L.

Für die verschiedenen Konstrukte wurden die Phytaseaktivitäten von ausgesuchten *Hordeum vulgare* Expressionslinien untersucht. Die Phytaseaktivitäten wurden im Gesamtproteinextrakt aus den Blättern bestimmt. Die Hintergrundaktivität des Wildtyps wurde von der Aktivität der transgenen Linien abgezogen. Die Phytaseaktivitäten der T<sub>0</sub>- und T<sub>1</sub>-Generationen sind in der Abbildung 32 vergleichend dargestellt. Die Aktivitätsangaben beziehen sich auf den Anteil der löslichen Proteine. Die Expressionslinien von *phyC<sub>cop</sub>* mit dem Signalpeptid des Proteinaseinhibitors II aus *Solanum tuberosum* (PSP) wiesen in der T<sub>0</sub>-Generation Aktivitäten von 29 und 41 mU/mg auf. Die T<sub>1</sub>-Generation zeigte Aktivitäten von 59 und 72 mU/mg. Das Konstrukt mit dem Signalpeptid der Oxalatoxidase A aus *Hordeum vulgare* (OxOA) besaß in der T<sub>0</sub>-Generation Aktivitäten von 72 und 68 mU/mg. In der T<sub>1</sub>-Generation befanden sich die Aktivitäten bei 149 und 156 mU/mg. Die das Phytasegen mit dem Signalpeptid der Chitinase 26 aus *Hordeum vulgare* tragenden Pflanzen (Chi26) zeigten in der T<sub>0</sub>-Generation Aktivitäten von 29 und 58 mU/mg und in der T<sub>1</sub>-Generation von 54 und 143 mU/mg. Die Expressionslinien von *phyK* mit dem Signalpeptid PSP hatten in der T<sub>0</sub>-Generation eine Phytaseaktivität zwischen 400 und 559 mU/mg. In der T<sub>1</sub>-Generation sind die Werte mit 839 und 922 mU/mg fast doppelt so hoch.



**Abbildung 32:** Vergleich der Phytaseaktivitäten der T<sub>0</sub> und T<sub>1</sub>-Generation der verschiedenen Konstrukte A) mit PhyC<sub>cop</sub> und (B) mit PhyK im Blatt von *Hordeum vulgare* Pflanzen. Die Bestimmung erfolgte im Standardaktivitätstest bei 37 °C im Gesamtproteinextrakt. Die spezifischen Phytaseaktivitäten sind bezogen auf das lösliche Protein im Gesamtproteinextrakt errechnet. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung, n=3.

### 2.1.4.3 Phytaseaktivitäten von PhyC und PhyK im Samenkornmehl von *Hordeum vulgare* L. cv. Golden Promise

Die Phytaseaktivitäten der Samen wurden aus den Gesamtproteinextrakten des Mehls reifer Samen der T<sub>1</sub>-Generation bestimmt. Die Messungen der Aktivitäten erfolgten beim jeweiligen pH- und Temperaturoptimum von PhyC und PhyK. Bei 65 °C und pH 7 zeigten die transgenen Samen eine bis zu 32fach höhere Phytaseaktivität (*phyCcopPSP*) im Vergleich zum Wildtyp Golden Promise (Tabelle 5). Das Konstrukt *phyCcopPSP* wies mit 2,63 U/ g Trockengewicht der Samen die höchste Phytaseaktivität auf. Die Linie 1 des Konstrukts *phyCcopChi26* hatte eine 22fach höhere Aktivität als Golden Promise, die Linie 8 hingegen nur eine 5fach höhere Aktivität als der Wildtyp. Die Linien des Konstrukts *phyCcopPSP* besaßen eine 20fach höhere Aktivität als der Wildtyp.

**Tabelle 5:** Phytaseaktivitäten bei pH 7 und 65 °C von PhyC im Samenkornmehl von *Hordeum vulgare* L. cv Golden Promise

GENOTYP	PHYTASEAKTIVITÄTEN BEI 65 °C [U/ G TROCKENGEWICHT SAMEN]
Golden Promise	0,081 ± 0,005
<i>phyCcopOxOA</i>	1,65 ± 0,13
<i>phyCcopChi26 1</i>	1,82 ± 0,23
<i>phyCcopChi26 8</i>	0,42 ± 0,03
<i>phyCcopPSP</i>	2,63 ± 0,31

Die bei 50 °C und pH 5 gemessenen Phytaseaktivitäten, der Linien des Konstruktes *phyKPS*, wiesen eine Erhöhung um das fast 24fache gegenüber dem Wildtyp Golden Promise (Tabelle 6).



**Tabelle 6:** Phytaseaktivitäten bei pH 5 und 37 °C von PhyC im Samenmehl von *Hordeum vulgare* L. cv Golden Promise

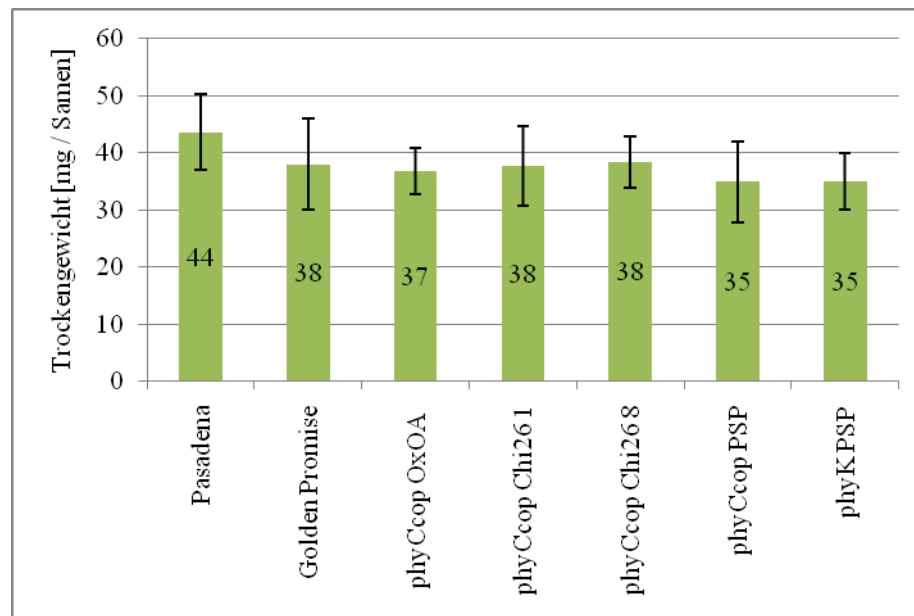
GENOTYP	PHYTASEAKTIVITÄTEN [U/ G TROCKENGEWICHT SAMEN]
Golden Promise	0,36 ± 0,02
<i>phy</i> KPSP	8,46 ± 0,57

#### 2.1.4.4 Trockenmasse, Gesamt-Phosphor-Gehalt, Phytinsäuregehalt und Gehalt an anorganischem Phosphor der Samen von *Hordeum vulgare* L. cv. Golden Promise mit *phyC*<sub>cop</sub> und *phyK*

##### 2.1.4.4.1 Trockenmasse der Samen der T<sub>1</sub>-Generation

Nach der Trocknung bei 65 °C wurde Freilandsaatgut des Wildtyps *Hordeum vulgare* L. cv. Pasadena, Saatgut aus dem Gewächshaus der Sorte Golden Promise und seiner transgenen Linien gewogen. Das Freilandsaatgut zeigte ein signifikant ( $P < 0,01$ ) höheres Gewicht pro Samenkorn als die Samen aus dem Gewächshaus. Die Gewichte der Samen der Expressionslinien unterschieden sich nicht signifikant von denen des Wildtyps (Abbildung 33). Weder die Expressionslinien mit *phyC*<sub>cop</sub> (OxOA, Chi26, PSP3, PSP6) noch die mit *phyK* (PSP5, PSP7) zeigten eine signifikante Veränderung ihrer Trockenmasse im Vergleich zum Wildtyp (GP). Das von (Yip, Wang et al. 2003) und (Lung 2005) für *Nicotiana tabacum* beschriebene „small seed syndrome“ konnte nicht für *Hordeum vulgare* L. cv. Golden Promise nachgewiesen werden. Untersuchungen von (Lung 2005) zeigten, dass dieser Effekt der Ausbildung von kleinen Samen auch nicht bei *Arabidopsis thaliana* auftritt. Auch eine Einschränkung der Keimfähigkeit der Samen konnte nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).





**Abbildung 33:** Vergleich der Gewichte der Samenkörner der einzelnen Expressionslinien von *phyC<sub>cop</sub>* und *phyK* mit dem Wildtyp *Hordeum vulgare* L. cv. Golden Promise. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung,  $n=50$ . Die Unterschiede sind nicht signifikant ( $P>0,05$ ).

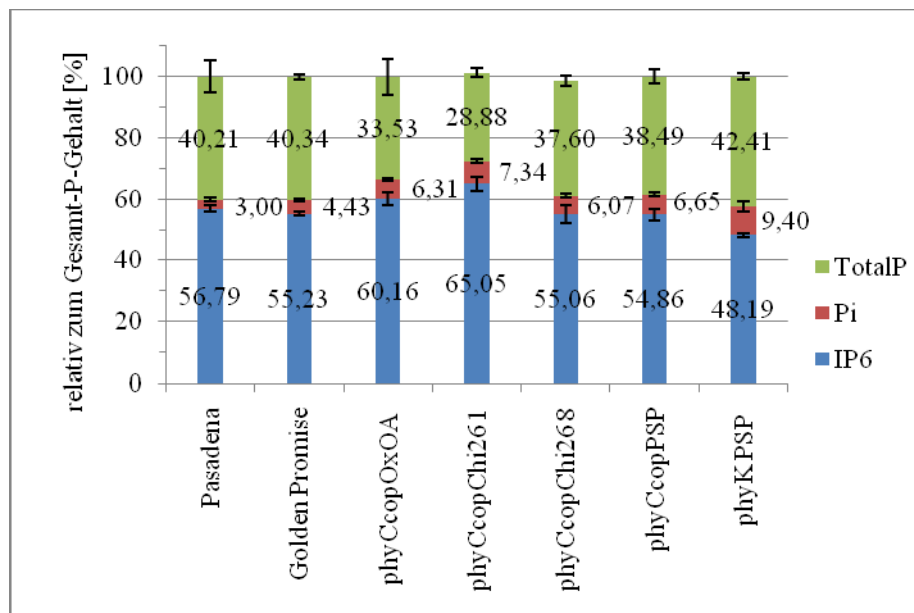
#### 2.1.4.4.2 Anteil von Phytinsäure und anorganischem Phosphor am Gesamtphosphor in den Samen

Phytinsäure ist natürlicherweise mit einem Anteil von 50-80 % am Gesamtphosphor die Hauptspeicherform von Phosphor in Samen. Veränderungen in der Zusammensetzung des Gesamtphosphors und des Gehalts an anorganischem Phosphat der Samen der Expressionslinien sowie des Wildtyps Golden Promise wurden nach Veraschung mit der Ammoniummolybdat/Vanadat-Methode photometrisch analysiert. Das Probenmaterial wurde sowohl beim Wildtyp als auch bei den Expressionslinien in Töpfen im Gewächshaus gezogen. Als Kontrolle der Messung wurde Freilandsaatgut der Sorte Pasadena untersucht. Der Anteil an Phytinsäure ergab sich mit Hilfe der HPIC-Analyse. Die prozentualen Anteile der Phytinsäure und des anorganischen Phosphors am Gesamtphosphor in den untersuchten Samen wurde in Abbildung 34 dargestellt. Bezogen auf den Gesamtphosphor der Samen war der Anteil an Phytinsäure bei den Expressionslinien mit *phyC<sub>cop</sub>* verglichen mit dem des Wildtyps gleich. Für *phyC<sub>cop</sub>OxOA* ergab sich eine signifikante Erhöhung des Phytinsäureanteils auf 60,2 % ( $P<0,05$ ). Bei *phyC<sub>cop</sub>Chi26* wurde zwischen den Linien 1 und 8 unterschieden, da sich zwischen ihnen große Unterschiede bezüglich der Expressionshöhe und des Phytinsäureanteils in den Samen zeigten. Die Linie *phyC<sub>cop</sub>Chi26 1* mit der hohen Phytaseexpression wies einen zum Wildtyp auf 65,1 % signifikant erhöhten Anteil der Phytinsäure am Gesamtphosphor auf. Für die Linie 8 mit der niedrigen

Phytaseexpression wurde ein Anteil der Phytinsäure von 55,1 % bestimmt. Sie zeigte damit keine Änderung im Vergleich zum Wildtyp.

Der Anteil an anorganischem Phosphor änderte sich bei allen transgenen Linien bei Gegenüberstellung der Messergebnisse mit denen des Wildtyps. Für *phyC<sub>cop</sub>OxOA* ergibt sich ein Anstieg von Pi auf 6,3 %, für *phyC<sub>cop</sub>Chi26 1* auf 7,34 %, für *phyC<sub>cop</sub>Chi26 8* auf 6,07 % und für *phyC<sub>cop</sub>PSP* auf 6,65 %.

Die Expressionslinien *phyKPSP* zeigten im Vergleich zum Wildtyp einen auf 48,2 % erniedrigten Anteil an Phytinsäure bei gleichzeitiger Erhöhung des Anteils an anorganischem Phosphor auf 9,4 %.



**Abbildung 34 :** Relative prozentuale Verteilung von Phytinsäure, anorganischem Phosphor und Rest-Phosphor in den Samen von *Hordeum vulgare* L. cv. Pasadena, *Hordeum vulgare* L. cv. Golden promise und seinen transgenen Linien. Der jeweilige Gesamtposphorgehalt ist 100 % gesetzt und die jeweiligen Anteile von Phytinsäure und anorganischem Phosphor berechnet worden. Als Rest-Phosphor sind alle anderen Phosphorhaltigen Verbindungen zusammengefasst worden.

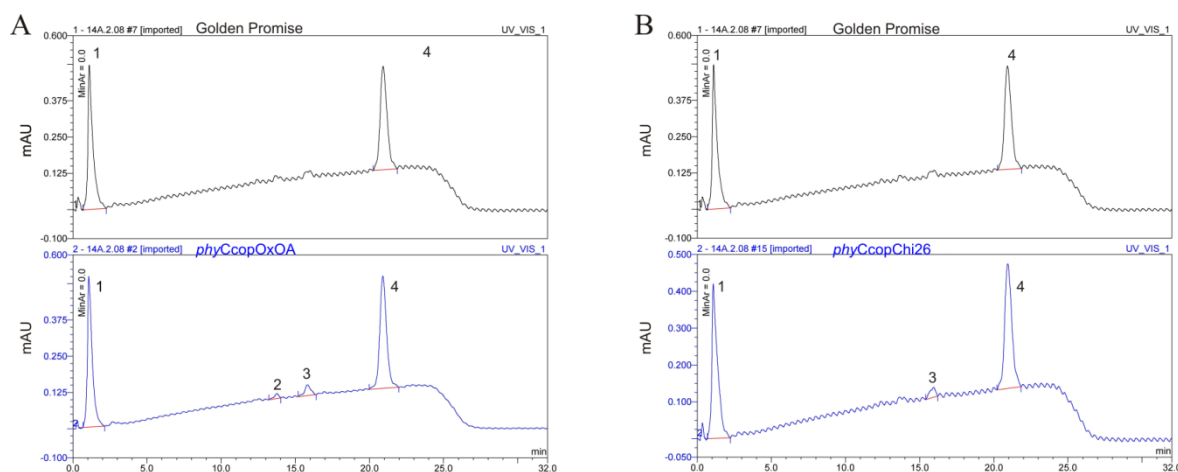
Da die Gesamtposphorgehalte der einzelnen Pflanzenlinien voneinander abwichen, wurden die Anteile von Phytinsäure und anorganischem Phosphor auf das Trockengewicht der Samen bezogen (Tabelle 7). Von den Expressionslinien mit *phyC<sub>cop</sub>* und vom Wildtyp unterschieden sich die mit dem OxOA-Signalpeptid und die Expressionslinie *phyC<sub>cop</sub>Chi26 1* durch eine Erhöhung um 3 % bzw. 6 % des Phytinsäuregehalts signifikant. Die Expressionslinien mit *phyK* wiesen einen um -19,3 % erniedrigten Phytinsäureanteil am Trockengewicht auf. Die Bestimmung des Anteils von Pi am Trockengewicht ergab, dass alle transgenen Linien eine deutliche Erhöhung des Gehaltes an anorganischem Phosphor im

Vergleich zum Wildtyp aufwiesen. Die Erhöhung des Anteils von Pi am Trockengewicht betrug für *phyC<sub>cop</sub>OxOA* 27,3 %, für *phyC<sub>cop</sub>Chi26 1* 48,5 %, für *phyC<sub>cop</sub>Chi26 8* 33,3 % und für *phyC<sub>cop</sub>PSP* 48,5 %. Die Linien mit *phyKPSP* zeigten eine Erhöhung um 78,8 %.

**Tabelle 7:** Vergleich des Phytinsäuregehalts und des Gehalts an anorganischem Phosphor in Samen von *Hordeum vulgare* cv. Golden Promise und seinen transgenen Linien. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD, n=6, Signifikante Unterschiede gekennzeichnet mit\*(P<0,05), \*(P<0,01).

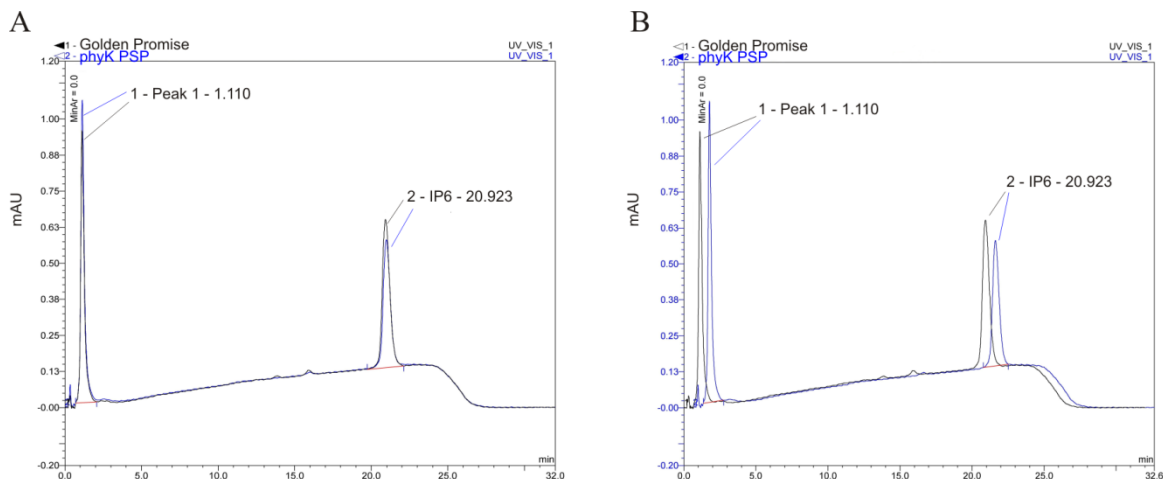
GENOTYP	PHYTINSÄURE- ANTEIL AM TROCKENGEWICHT [%]	PHYTINSÄURE- ANTEIL [%]	Pi ANTEIL AM TROCKENGEWICHT [%]	Pi [%]
Pasadena	<b>0,85 <math>\pm</math> 0,045</b>	-	<b>0,020 <math>\pm</math> 0,005</b>	-
Golden Promise	<b>1,45 <math>\pm</math> 0,013</b>	<b>100 <math>\pm</math> 0,89</b>	<b>0,033 <math>\pm</math> 0,002</b>	<b>100 <math>\pm</math> 6,10</b>
<i>phyC<sub>cop</sub>OxOA</i>	<b>1,49 <math>\pm</math> 0,015</b>	<b>103,14 <math>\pm</math> 0,99*</b>	<b>0,042 <math>\pm</math> 0,0002</b>	<b>127,27 <math>\pm</math> 0,48**</b>
<i>phyC<sub>cop</sub>Chi26 1</i>	<b>1,54 <math>\pm</math> 0,054</b>	<b>106,22 <math>\pm</math> 2,01*</b>	<b>0,049 <math>\pm</math> 0,006</b>	<b>148,49 <math>\pm</math> 12,24**</b>
<i>phyC<sub>cop</sub>Chi26 8</i>	<b>1,42 <math>\pm</math> 0,062</b> <b>102,</b>	<b>0 <math>\pm</math> 4,35</b>	<b>0,044 <math>\pm</math> 0,0015</b>	<b>133,33 <math>\pm</math> 4,55**</b>
<i>phyC<sub>cop</sub>PSP</i>	<b>1,44 <math>\pm</math> 0,024</b>	<b>99,6 <math>\pm</math> 2,57</b>	<b>0,049 <math>\pm</math> 0,004</b>	<b>148,49 <math>\pm</math> 8,16**</b>
<i>phyK PSP</i>	<b>1,17 <math>\pm</math> 0,003</b>	<b>80,73 <math>\pm</math> 2,07**</b>	<b>0,059 <math>\pm</math> 0,003</b>	<b>178,79 <math>\pm</math> 5,08**</b>

Die HPIC-Profile des Mehls der reifen Samen des Wildtyps und der Expressionslinien von *phyC<sub>cop</sub>* sind in Abbildung 35 dargestellt. Die Profile zeigten einen Hauptpeak (4) für *InsP6* und für die transgenen Linien Spuren von DL-*Ins*(1,2,4,5,6)P5 (3). Die Expressionslinie mit OxOA-Signalpeptid wies desweiteren Spuren von *Ins*(1,2,3,4,5)P5 auf.



**Abbildung 35:** HPIC-Analyse des IP6-Gehalts der Samen von *Hordeum vulgare* L. c.v. Golden Promise und den Expressionslinien *phyC<sub>cop</sub>OxOA* und *phyC<sub>cop</sub>Chi26*. A) HPIC-Läufe von Wildtyp (Golden Promise, schwarz) und der transgenen Form mit OxOA-Signalpeptid (blau) B) Darstellung der HPIC-Läufe wie A) aber transgene Form mit Chi26-Signalpeptid Peaks: 1: Lösungsmittel, Phosphat und IP1; 2: *Ins*(1,2,3,4,5)P5; 3: *Ins*(1,2,4,5,6)P5; 4: *Ins*(1,2,3,4,5,6)P6. Die Auswertung erfolgte mit Peaknet 6.5 (Dionex) (Natuphos-Methode). Die Überlagerungen wurden mit Chromeleon (Dionex) angefertigt.

Die Reduktion des Phytinsäuregehalts und der höhere Gehalt an Pi der Linien mit *phyK* ist im HPIC-Lauf sichtbar (Abbildung 36). Die Chromatogramme wurden mit dem Programm Peaknet 6.5 (Dionex) ausgewertet. Anhand der Retentionszeiten einer IP6-Standardlösung, konnte das *InsP6* identifiziert und seine Konzentration bestimmt werden.



**Abbildung 36:** HPIC-Analyse des IP6-Gehalts der Samen von *phyK* PSP. A) übereinander gelegte HPIC-Läufe von Wildtyp (Golden Promise, schwarz) und der transgenen Form mit *PhyK* (*phyK* PSP, blau) B) Darstellung der HPIC-Läufe wie A) aber als Timeshift. Peaks: 1: Lösungsmittel, Phosphat und IP1; 2: 2-IP6 *Ins*(1,2,3,4,5,6)P6. Die Auswertung erfolgte mit Peaknet 6.5 (Dionex) (Natuphos-Methode). Die Überlagerungen wurden mit Chromeleon (Dionex) angefertigt.

Der Vergleich der Gesamtphosphorgehalte wurde in Tabelle 8 aufgeführt. Dieser zeigte, dass alle Linien eine leichte Reduktion am Gesamtphosphorgehalt bezogen auf das Trockengewicht gegenüber dem Wildtyp aufwiesen.

**Tabelle 8:** Vergleich der Gesamt-Phosphor-Gehalte der Samen von *Hordeum vulgare* cv. Golden Promise und der transgenen Linien. Als Referenzwert wurde *Hordeum vulgare* L. cv. Pasadena Freilandsaatgut mitgeführt.

GENOTYP	GESAMT-P [MG/ G]	REDUKTION [%]
Pasadena	<b>4,20 ± 0,23</b>	-
Golden Promise	<b>7,38 ± 0,07</b>	<b>0</b>
<i>phyC<sub>cop</sub>OxOA</i>	<b>6,82 ± 0,40</b>	<b>7,59</b>
<i>phyC<sub>cop</sub>Chi26</i>	<b>6,92 ± 0,10</b>	<b>3,62</b>
<i>phyC<sub>cop</sub>PSP</i>	<b>7,17 ± 0,15</b>	<b>2,85</b>
<i>phyK</i> PSP	<b>6,98 ± 0,12</b>	<b>5,42</b>

## 2.1.5 Aufreinigung der heterolog exprimierten Phytasen aus den Wirtsorganismen

Da beide Phytaseproteine nicht mit einem Peptid-Tag fusioniert sind, können sie nicht über eine immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie, wie z.B. mit Ni-NTA, gereinigt werden. Für die Aufreinigung aus den verschiedenen Organismen war es notwendig, sämtliche zur Verfügung stehende konventionelle chromatographische und andere Verfahren anzuwenden, um für jedes Phytaseprotein aus jedem Organismus eine eigene Aufreinigungsstrategie zu entwickeln. Zu den für die Strategieentwicklung verwendeten Verfahren zählen Fällungen, hydrophobe Interaktionschromatographie, Ionenaustauschchromatographie mit schwachen und starken Anionen- und Kationenaustauschern, Gelfiltration und klassische Affinitäts-chromatographische Methoden.

### 2.1.5.1 Aufreinigung von PhyC aus verschiedenen Organismen

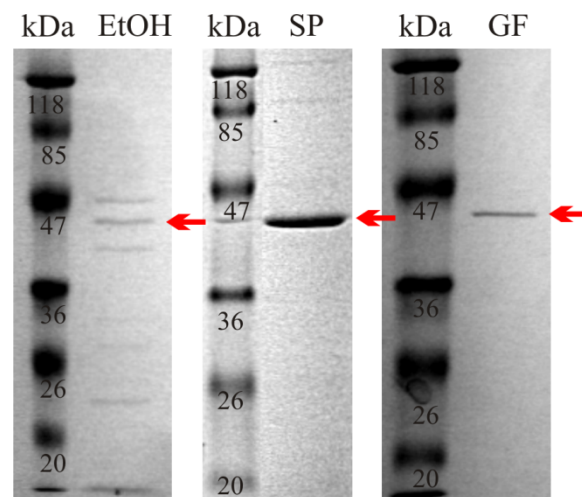
#### 2.1.5.1.1 Aufreinigung aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45

Während der stationären Phase sekretiert FZB45 die Phytase in das ihn umgebende Medium. Die Reinigung aus dem Kulturüberstand erfolgte über mehrere Stufen. Nach einer Ethanolfällung, Dialyse, Kationenaustauschchromatographie und Gelfiltration wurde ein 17facher Reinigungsfaktor erzielt (Tabelle 9). Die spezifische Aktivität betrug im Standardaktivitätstest 19,04 U/mg bei 37 °C. Die aus FZB45 isolierte PhyC wurde zum späteren Vergleich bei der Charakterisierung der rekombinanten Phytasen herangezogen.

**Tabelle 9:** Reinigung der PhyC von *B. amyloliquefaciens* FZB45. Ausgangspunkt ist der, während der stationären Wachstumsphase von FZB45 durch Zentrifugation, gewonnene Kulturüberstand.

METHODE	VOLUMEN [ML]	PROTEIN- KONZ. [MG/ML]	VOLUMEN- AKTIVITÄT [U/ML]	ENZYM- MENGE [U]	SPEZIF. AKTIVITÄT [U/MG]	REINIGUNGS- FAKTOR	AUSBEUTE [%]
ÜBERSTAND	100	0,121	0,134	13,4	1,11	1	100
ETOH- FÄLLUNG	50	0,070	0,118	5,9	1,69	1,51	43,78
DIALYSE	50	0,048	0,087	4,35	1,81	1,65	32,47
S-SEPHAROSE	7	0,018	0,217	1,52	12,06	10,76	11,32
GELFILTRATION	6	0,0105	0,200	1,20	19,04	17,15	8,96

Die SDS-PAGE in Abbildung 37 weist aus, dass keine Verunreinigungen mit anderen Proteinen vorlagen. Die Berechnung des RF-Wertes aus der SDS-PAGE ergibt eine Größe von  $41,1 \pm 0,2$  kDa für die native Phytase.



**Abbildung 37:** Beispiel Coomassie-gefärbte SDS-PAGE der verschiedenen Reinigungsschritte der PhyC aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45. Nach der Fällung des Kulturüberstandes mit 96 %igem Ethanol (EtOH) erfolgte eine Kationenaustauschchromatographie mit einer SP-Sepharosesäule. Als zweiter Chromatografieschritt wurde eine Gelfiltration (GF) durchgeführt. Die Bande von PhyC im Gel ist mit roten Pfeilen gekennzeichnet.

#### 2.1.5.1.2 Aufreinigung von PhyC aus *Nicotiana tabacum*

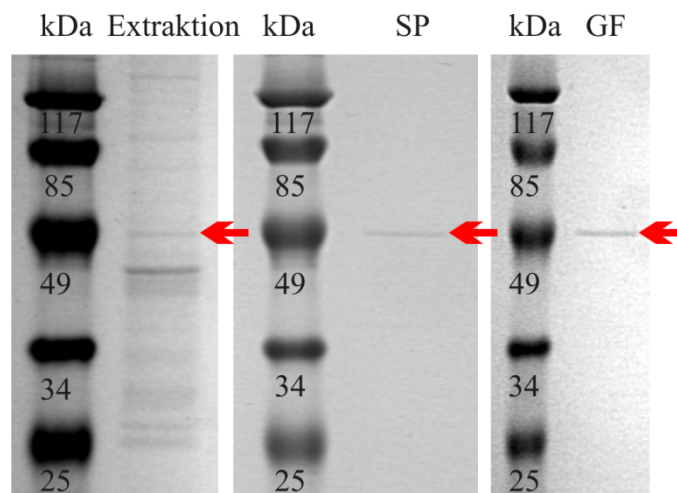
Als Material für die Aufreinigung wurden frische Blätter der T<sub>2</sub>-Generation eingesetzt. Die Aufreinigung erfolgte über mehrere Stufen (Tabelle 10). Es wurden ein Reinigungsfaktor von 68,3 und eine Ausbeute von 4,7 % erzielt. Die spezifische Phytaseaktivität betrug 6,76 U/mg bei 37 °C. Das gereinigte Protein diente der biochemischen Charakterisierung und den folgenden kinetischen Untersuchungen.

**Tabelle 10:** Beispiel Reinigungstabelle der Phytasereinigung PhyC aus dem Blatt von *Nicotiana tabacum* pMA-P1. Ausgangspunkt für die Aufreinigung ist die Homogenisierung von 24,2 g Blattmaterial in 100 ml Extraktionspuffer.

METHODE	VOLUMEN [ML]	PROTEIN- KONZ. [MG/ML]	VOLUMEN- AKTIVITÄT [U/ML]	ENZYM- MENGE [U]	SPEZIF. AKTIVITÄT [U/MG]	REINIGUNGS- FAKTOR	AUSBEUTE [%]
EXTRAKTION	100	0,388	0,0386	3,86	0,099	1	100
ETOH- FÄLLUNG	30	0,090	0,0514	1,543	0,572	5,78	39,97
DIALYSE	50	0,027	0,024	1,212	0,898	9,071	31,40
S-SEPHAROSE	23	0,016	0,032	0,739	2,01	20,30	19,15
GELFILTRATION	4,5	0,006	0,041	0,183	6,76	68,28	4,74

In Abbildung 38 wurden verschiedene Reinigungsschritte von PhyC aus *Nicotiana tabacum* als SDS-PAGE dargestellt. Nach der SP-Sepharose-Säule waren noch Verunreinigungen in der SDS-PAGE erkennbar, die nach anschließender Gelfiltration nicht mehr fest-

stellbar waren. Die Proteinbande der aus *Nicotiana tabacum* gereinigten PhyC hat nach Bestimmung des RF-Wertes ein Molekulargewicht von  $50,5 \pm 0,1$  kDa.



**Abbildung 38:** Beispiel Coomassie-gefärbte SDS-PAGE der verschiedenen Reinigungsschritte von PhyC aus *Nicotiana tabacum*. Nach der Extraktion mit Hilfe von 50 mM Naacetatpuffer pH 5 wurde der Totalproteinextrakt mit Hilfe des Kationenaustauschers SP-Sepharose (SP) gereinigt, als zweiter Schritt wurde eine Gel-filtration (GF) durchgeführt. Die Phytasebande ist mit roten Pfeilen markiert.

#### 2.1.5.1.3 Aufreinigung von PhyC aus *Hordeum vulgare*

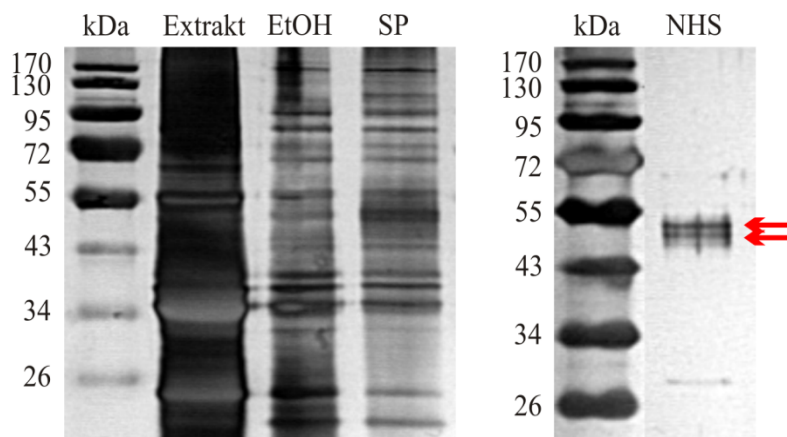
Als Material für die Aufreinigung dienten frische Blätter der T<sub>2</sub>-Generation der Pflanzen mit der Expressionskassette von p6D35S-Pcop. Die Aufreinigung erfolgte über mehrere Stufen (Tabelle 11). Der Reinigungsfaktor betrug 76,7 und die Ausbeute 0,6 %. Die rekombinante Phytase hatte bei 37 °C eine spezifische Aktivität von 6,83 U/mg. Das aufgereinigte Protein wurde für die biochemische Charakterisierung und die kinetischen Untersuchungen eingesetzt.

**Tabelle 11:** Beispiel: Reinigungstabelle PhyC aus *Hordeum vulgare*.

METHODE	VOLUMEN [ML]	PROTEIN-KONZ. [MG/ML]	VOLUMEN-AKTIVITÄT [U/ML]	ENZYM-MENGE [U]	SPEZIF. AKTIVITÄT [U/MG]	REINIGUNGS-FAKTOR	AUSBEUTE [%]
EXTRAKTION	162	0,8956	0,0795	12,88	0,089	1	100
ETOH-FÄLLUNG	25	0,7019	0,1	2,495	0,142	1,49	19,58
SP-SEPHAROSE	9,5	0,0268	0,05	0,471	1,85	19,47	3,70
NHS-SÄULE	1,5	0,0074	0,050	0,076	6,83	76,74	0,59

Die Abbildung 39 stellt die mit Silber gefärbte SDS-PAGE der verschiedenen Reinigungsstufen von PhyC aus *Hordeum vulgare* dar. Nach der Affinitätschromatographie mit der Antikörpersäule (NHS) waren in der SDS-PAGE drei Proteinbanden erkennbar. Nach Be-

stimmung der RF-Werte betrugen die Größen der beiden mit roten Pfeilen gekennzeichneten Proteinbanden  $52,0 \pm 0,6$  kDa und  $53,5$  kDa  $\pm 0,26$  kDa. Bei ihnen handelt es sich um die unterschiedlich stark glykosylierten Varianten von PhyC. Die dritte Proteinbande ist vermutlich eine Abbaubande von PhyC oder eine Verunreinigung mit einem anderen Protein, das in geringen Mengen von den polyklonalen Antikörpern gebunden wurde.



**Abbildung 39:** Beispiel Silber-gefärbte SDS-PAGE der verschiedenen Reinigungsschritte der PhyC aus *Hordeum vulgare*. Nach der Extraktion mit Hilfe von 50 mM Na-Acetatpuffer pH 5 (Extrakt) wurde der Totalproteinextrakt mit Ethanol (EtOH) gefällt. Mit Hilfe des Kationenaustauschers SP-Sepharose (SP) wurde eine Säulenchromatographie durchgeführt. Als zweiter Chromatographieschritt wurde eine NHS-aktivierte HP-Antikörpersäule (NHS) genutzt. Die Phytasebanden sind mit roten Pfeilen markiert.

### 2.1.5.2 Aufreinigung von PhyK aus verschiedenen Organismen

#### 2.1.5.2.1 Aufreinigung von PhyK aus *Arxula adeninivorans*

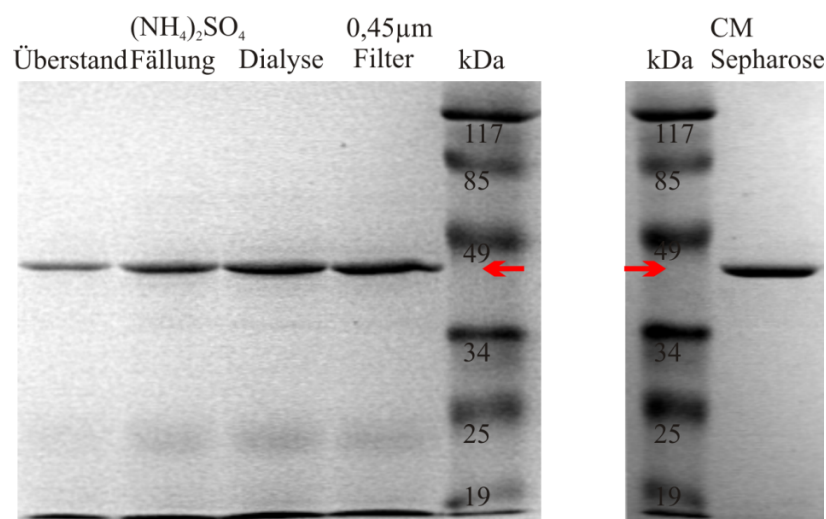
Die Reinigung von PhyK aus dem Kulturüberstand von *Arxula adeninivorans* erfolgte analog dem von (Herter 2009) entwickelten Verfahren. Der Reinigungsfaktor betrug 36 und die Ausbeute 48 % (Tabelle 12). Die rekombinante Phytase zeigte eine spezifische Aktivität von 484 U/mg. Das gewonnene Protein war Ausgangsmaterial für die biochemische Charakterisierung und die kinetischen Untersuchungen.

**Tabelle 12:** Reinigungstabelle der Aufreinigung von PhyK aus *Arxula adeninivorans*.

METHODE	VOLUMEN [ML]	PROTEIN-KONZ. [MG/ML]	VOLUMEN-AKTIVITÄT [U/ML]	ENZYM-MENGE [U]	SPEZIF. AKTIVITÄT [U/MG]	REINIGUNGS-FAKTOR	AUSBEUTE [%]
ÜBERSTAND	400	0,081	1,09	436	13,46	1	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -FÄLLUNG	40	0,412	11,87	474,8	28,81	2,14	108,90
DIALYSE	50	0,238	6,53	326,50	27,44	2,04	74,89
0,45 µM FILTER	50	0,234	5,72	286	24,44	1,82	65,60
CM-SEPHAROSE	10	0,043	20,81	208,13	484,02	35,97	47,74



In der Abbildung 40 stellt die SDS-PAGE der Aufreinigung von PhyK aus *Arxula adeninivorans* dar. Die Proteingröße stimmt mit dem von (Sajidan, Farouk et al. 2004) gemessenen Wert von 42 kDa überein.



**Abbildung 40:** Coomassie-gefärbte SDS-PAGE der Reinigung von PhyK aus dem Kulturüberstand von *Arxula adeninivorans*. Die Phytasebande ist mit roten Pfeilen markiert.

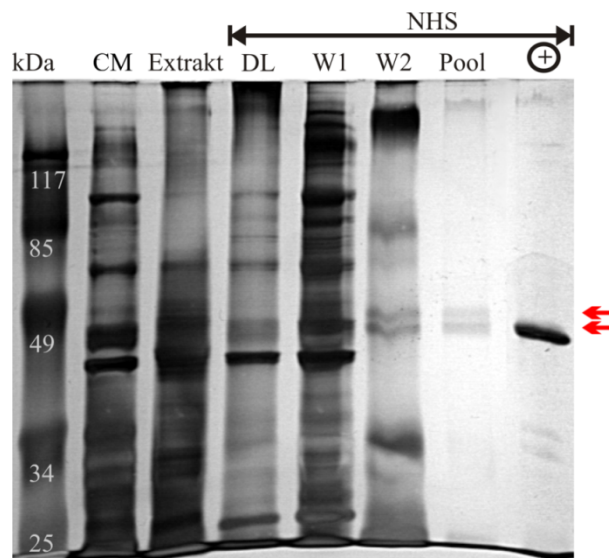
#### 2.1.5.2.2 Aufreinigung von PhyK aus *Nicotiana tabacum*

Die Aufreinigung erfolgte aus frischen Blättern der T<sub>2</sub>-Generation über mehrere Stufen (Tabelle 13). Bei einem Reinigungsfaktor von 80 betrug die Ausbeute 2 %. Die spezifische Phytaseaktivität hatte eine Höhe von 116,7 U/mg. Das so erhaltene Protein wurde für die biochemische Charakterisierung und die kinetischen Untersuchungen benutzt.

**Tabelle 13:** Reinigungstabelle der Reinigung von PhyK aus *Nicotiana tabacum* pMA-R1.

METHODE	VOLUMEN [ML]	PROTEIN- KONZ. [MG/ML]	VOLUMEN- AKTIVITÄT [U/ML]	ENZYM- MENGE [U]	SPEZIF. AKTIVITÄT [U/MG]	REINIGUNGS- FAKTOR	AUSBEUTE [%]
EXTRAKTION	334	0,526	0,198	66,098	0,38	1	100
CM- SEPHAROSE	10,5	0,135	1,328	13,942	9,85	26,19	21,09
NHS-SÄULE	0,5	0,024	2,785	1,393	116,67	79,48	2,11

Sowohl der Waschschrift W2 als auch der Pool der NHS-Säule zeigten eine doppelte Phytasebande (Abbildung 41). Die Größe der unteren Bande beträgt 42,9 kDa und die der darüber liegenden ca. 45,8 kDa.



**Abbildung 41:** Beispiel einer Silber-gefärbten SDS-PAGE der Reinigung von PhyK aus *Nicotiana tabacum*. Auf das Gel wurden neben dem Proteinmarker, der Pool der CM-Sepharose-Säule (CM), der Totalproteinextrakt (Extrakt), der Durchlauf (DL), die Waschschritte (W1, W2) der Pool der NHS-Säule (Pool) und PhyK aus *Arxula adenivorans* als Positiv-Kontrolle (+) aufgetragen. Die Proteinbanden von PhyK sind mit roten Pfeilen markiert.

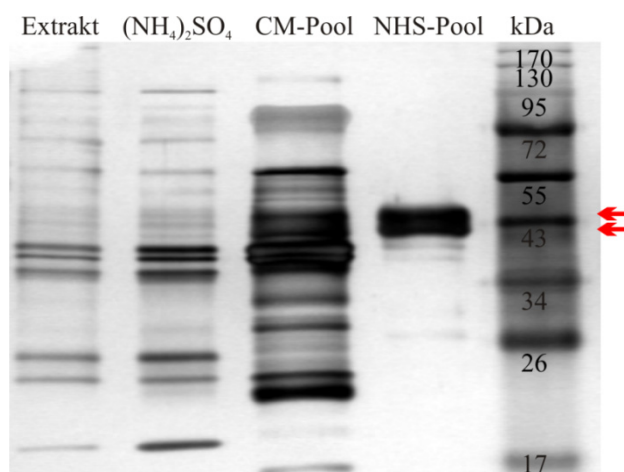
#### 2.1.5.2.3 Aufreinigung von PhyK aus *Hordeum vulgare*

Die Aufreinigung der Phytase PhyK erfolgte wiederum aus Blattmaterial von *Hordeum vulgare* pMA-R1 der T<sub>2</sub>-Generation. Nach mehreren Reinigungsstufen betrug die Ausbeute 3,7 % und der Reinigungsfaktor 292 (Tabelle 14). Die spezifische Aktivität zeigte eine Höhe von 254 U/mg. Das aus mehreren Reinigungen gewonnene Protein wurde dann gepoolt und für die biochemische Charakterisierung und die kinetischen Untersuchungen eingesetzt.

**Tabelle 14:** Beispiel Reinigungstabelle von PhyK aus *Hordeum vulgare* pMA-R1

METHODE	VOLUMEN [ML]	PROTEIN- KONZ. [MG/ML]	VOLUMEN- AKTIVITÄT [U/ML]	ENZYM- MENGE [U]	SPEZIF. AKTIVITÄT [U/MG]	REINIGUNGS- FAKTOR	AUSBEUTE [%]
EXTRAKTION	723	0,258	0,2235	161,59	0,87	1	100
60 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	230	0,1147	0,700	161	6,10	7,01	99,63
CM- SEPHAROSE	17	0,2657	4,247	72,20	15,98	18,26	44,68
NHS-SÄULE	0,5	0,0469	11,91	5,96	253,94	291,89	3,69

Bei elektrophoretischer Auftrennung mittels SDS-PAGE zeigte der Phytase-haltige Pool der NHS-Säule eine Proteindoppelbande (Abbildung 42). Die untere besitzt eine Größe von 42,8 kDa und die obere Bande von 46,5 kDa.



**Abbildung 42:** Silber-gefärbte SDS-PAGE einer Beispielreinigung von PhyK aus *Hordeum vulgare*. Auf das Gel wurde der Totalproteinextrakt (Extrakt), die dialysierte Probe nach der Ammoniumsulfatfällung  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , der Pool der CM-Sepharose-Säule (CM-Pool), der Pool der NHS-Säule (NHS-Pool) und der Proteinmarker, aufgetragen. Die Proteinbanden von PhyK sind mit einem roten Pfeil markiert.

## 2.1.6 Biochemische Charakterisierung der rekombinanten Phytasen

### 2.1.6.1 Nachweis der Glykosylierung

Pflanzen und Hefen sind in der Lage posttranslationale Modifikationen von Proteinen auszuführen. Eine der häufigsten ist die Glykosylierung. Sie ist ein enzymatischer Prozess, bei dem Saccharide mit spezifischen Aminosäuren einer Proteinkette verbunden werden. Man unterscheidet zwei Haupttypen der Proteinglykosylierung, die N-Glykosylierung und die O-Glykosylierung. Es ist notwendig zu wissen ob die heterolog exprimierten Proteine später glykosyliert vorliegen, da Glykosylierungen einen Einfluss auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Proteins, auf seine Faltung, Stabilität und biologische Aktivität haben können.

Da die Signalpeptide vor den Phytasegenen in den Expressionskassetten für *Arxula adenivorans*, *Nicotiana tabacum* und für *Hordeum vulgare* sekretorische sind, war es möglich, dass die rekombinanten Proteine glykosyliert vorlagen. Ein erster Hinweis für eine mögliche Glykosylierung bei der in *Nicotiana tabacum* und *Hordeum vulgare* exprimierten Phytase PhyC war das unterschiedliche Laufverhalten der gereinigten Phytase aus *Nicotiana tabacum* gegenüber der aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 gereinigten. Auch die, im SDS-Gel aufgetretene Doppelbande von PhyK, könnte ein Hinweis auf eine Glykosylierung sein.

Deshalb wurde das Vorliegen möglicher Glykosylierungen durch drei verschiedene Verfahren untersucht:

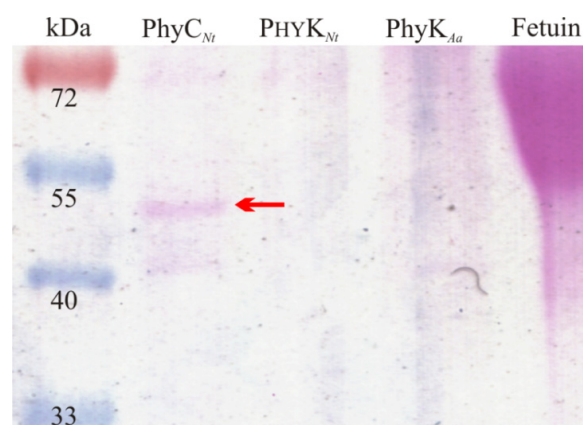
1. Die theoretische Berechnung möglicher Glykosylierungsstellen mittels der Programme NetNGlyc 1.0 und NetOGlyc 3.1 der Technical University Denmark
2. Die Anwendung eines Färbungsverfahrens für Glykoproteine im SDS-Gel, die PAS-Färbung
3. Die transiente Expression unter Tunicamycineinfluss zum Nachweis von N-Glykosylierungen von Proteinen

#### 2.1.6.1.1 Theoretische Berechnung der N- und O-Glykosylierung

Das Programm NetNGlyc 1.0 hatte für PhyC drei mögliche N-Glykosylierungsstellen an den Positionen 121 (Motiv NRSE), 138 (Motiv NGTL) und 243 (Motiv NGTV) und für PhyK keine N-Glykosylierungsstelle errechnet. Mit NetOGlyc 3.1 wurde für PhyC keine und für PhyK eine O-Glykosylierungsstelle an Position 42 an einem Threoninrest vorhergesagt.

#### 2.1.6.1.2 Nachweis durch PAS-Färbung

Die PAS-Färbung erschien geeignet Zuckerreste in Glykoproteinen, Lipiden und Nukleinsäuren nachzuweisen. Die durch Periodat oxidierten Glykoproteine wurden mit Schiff's-Reagenz umgesetzt. Lag eine Glykosylierung der Proteine vor, zeigten diese eine violette Färbung. In der mit PhyC beladenen Geltasche deutete die schwache violette Bande auf eine Glykosylierung des Proteins hin (Abbildung 43). Für PhyK konnte weder bei dem in *Nicotiana tabacum* noch dem in *Arxula adeninivorans* produzierten Protein eine Glykosylierung sichtbar gemacht werden. Als Kontrolle diente das Glykoprotein Fetuin aufgetragen. Dieses zeigte eine deutliche violette Färbung.



**Abbildung 43:** Nachweis von posttranslationalen Modifikationen der Phytaseproteine durch PAS-Färbung eines 12 %igen SDS-Gels. Die angefärbte Phytasebande von PhyC isoliert aus *Nicotiana tabacum* (PhyC<sub>Nt</sub>) ist mit einem roten Pfeil markiert. PhyK isoliert aus *Nicotiana tabacum* (PhyK<sub>Nt</sub>) und PhyK isoliert aus *Arxula adeninivorans* (PhyC<sub>Aa</sub>) zeigen keine Bande. Als Positiv-Kontrolle dient das Glykoprotein Fetuin.

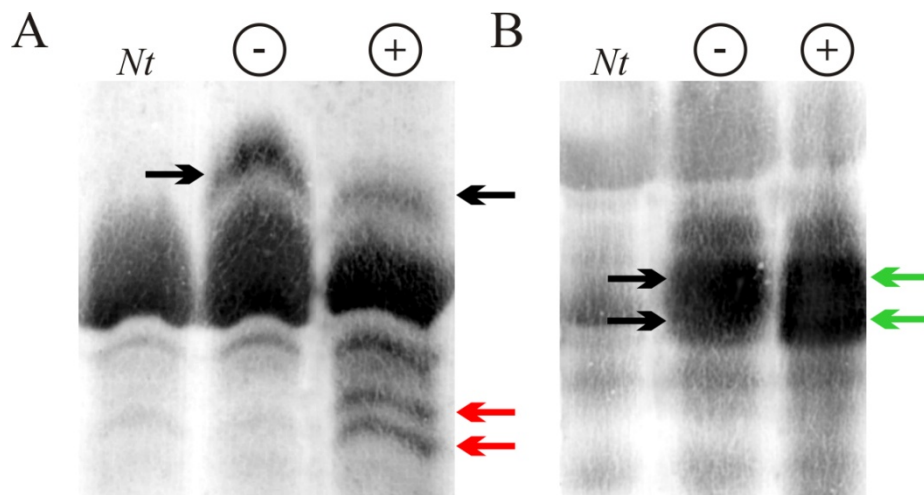
### 2.1.6.1.3 Nachweis durch Deglykosylierung

#### 2.1.6.1.3.1 Transiente Expression von *phyC* und *phyK* in *Nicotiana tabacum* unter Tunicamycineinfluss

Studien mit Tunicamycin haben gezeigt, dass dieses die Glykosylierung von Asparaginresten durch die Unterbindung der Synthese von Lipid-gebundenen Oligosaccharid-Vorstufen verhindert (Faye and Chrispeels 1989). Tunicamycin ist ein Gemisch aus homologen Nukleosid-Antibiotika, welche aus *Streptomyces lysosuperficus* isoliert wurden. Es inhibiert das Enzym N-Acetylglucosamin-Phosphotransferase (GPT), welches den ersten Schritt in der Verknüpfung der Fettsäure mit dem Saccharid, d.h. den Transfer von N-Acetylglucosamin-1-phosphat von UDP-N-Acetylglucosamin zu Dolicholphosphat katalysiert. An das werden normalerweise die weiteren Zucker des Oligosaccharides geknüpft. Durch diese Hemmung der N-Glykosylierung besteht die Möglichkeit während der transienten Expression verschiedene N-Glykosylierungsstufen von Proteinen sichtbar zu machen.

Um zu klären, ob und an wie vielen Stellen eine mögliche N-Glykosylierung stattgefunden hat, wurde eine transiente Expression im *Nicotiana tabacum* Blatt unter Tunicamycineinfluss durchgeführt. Dazu wurde das Tunicamycin 48 h nach Expressionsbeginn in das Blatt infiltriert und für 24 h inkubiert. Im Ergebnis liegt eine N-Glykosylierung von PhyC an mindestens zwei Stellen vor, da neben der schon vorhandenen Expressionsbande noch zwei weitere Banden unter Tunicamycineinfluss entstanden (Abbildung 44). Nach Berechnung der Masse der unter Tunicamycineinfluss entstandenen Banden anhand der RF-Werte ergeben sich für untere Bande 45,5 kDa und für die obere 47,2 kDa. Ohne Tunicamycin beträgt die Masse von PhyC 55,7 kDa.

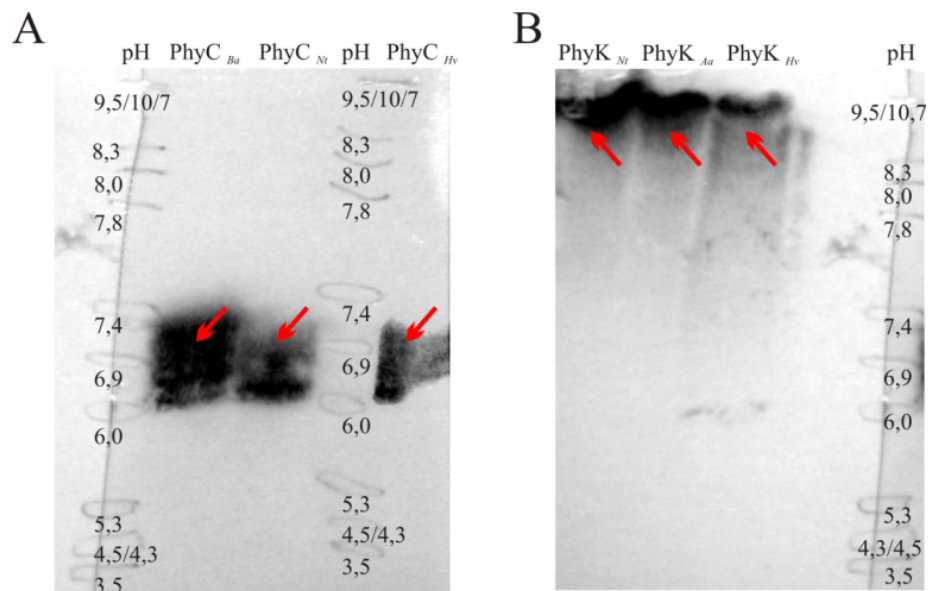
Bei PhyK ist keine N-Glykosylierung nachweisbar, da bei der Expression sowohl mit, als auch ohne Tunicamycin, im Westernblot Veränderung nicht erkennbar sind. Eine eventuelle O-Glykosylierung von PhyK kann nicht ausgeschlossen werden, weil durch Tunicamycin nur die N-Glykosylierung gehemmt wurde.



**Abbildung 44:** Westernblot-Analyse des Einflusses von Tunicamycin auf die posttranslationale Modifikation von PhyC (A) und PhyK (B) in *Nicotiana tabacum*. Der Wildtyp (*Nt*) zeigt weder nach 72 h noch nach 120 h eine Expressionsbande. Bei Expression für 72 h ohne Tunicamycin (-) ist die Bildung von PhyC und PhyK (Markierung mit schwarzem Pfeil) anhand der Proteinbande erkennbar. Bei Einwirkung von Tunicamycin (+) für 24 h wird die N-Glykosylierung von PhyC gestört und es treten zwei weitere Banden (Markierung mit rotem Pfeil) auf. Bei PhyK ist nach der Behandlung mit Tunicamycin keine Änderung der Proteinbanden erkennbar (grüne Pfeile).

#### 2.1.6.2 Isoelektrische Fokussierung

Zur Charakterisierung der Ladungseigenschaften von Proteinen verwendet man die isoelektrische Fokussierung (IEF). Die Proteine werden hierbei in einem Gel mit pH-Gradient elektrophoretisch getrennt und wandern solange zur Kathode bis sie eine pH-Region im Gel erreichen bei der ihre Nettoladung 0 beträgt. An diesem Punkt liegt der Isoelektrische Punkt (IP) des Proteins. Der Isoelektrische Punkt von PhyC lag zwischen pH 6 und pH 7, sowohl für die Phytase aus FZB45 als auch die rekombinanten Proteine aus *Nicotiana tabacum* und *Hordeum vulgare* (Abbildung 45). Der theoretische Isoelektrische Punkt von 4,91 errechnete sich mit Hilfe des ExPaSy Proteomics Servers (Swiss Institute of Bioinformatics). Für die PhyK aus *Arxula adeninivorans*, aus *Nicotiana tabacum* und *Hordeum vulgare* wurde der IP mit ca. pH 9 bestimmt (Abbildung 45). Der theoretische IP konnte mit ExPaSy zu pH 8,7 ermittelt werden.

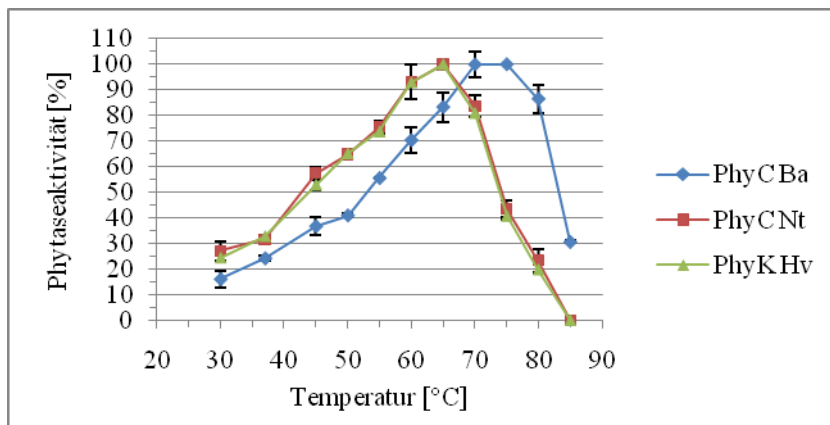


**Abbildung 45:** Westernblot der isoelektrischen Fokussierung der gereinigten Phytase-Proteine PhyC (A) und PhyK (B). Die aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 (Ba), *Nicotiana tabacum* (Nt), *Arxula adeninivorans* (Aa) und *Hordeum vulgare* (Hv) gereinigten Phytasen wurden auf ein IEF Gel (Biorad) aufgetragen und nach Herstellerangaben aufgetrennt. Als Standard wurde der IEF-Marker 3-10 von Serva verwendet. Die Proteinbanden sind mit roten Pfeilen markiert.

### 2.1.6.3 Temperaturoptimum und Thermostabilität von PhyC

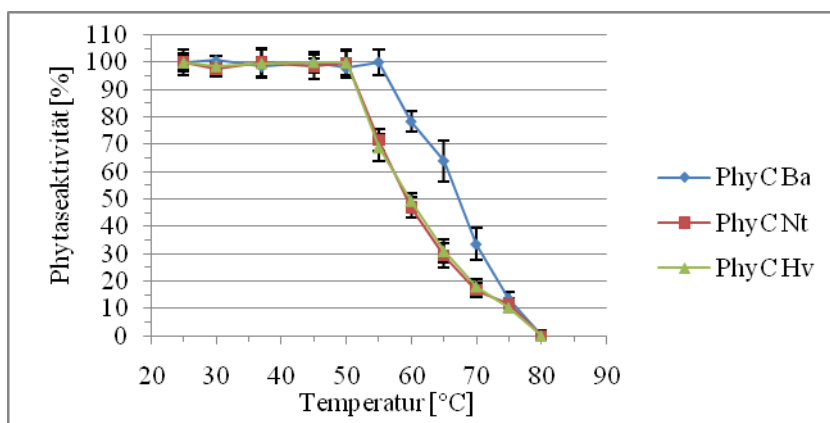
Das Temperaturoptimum, der aus rekombinanten *Nicotiana tabacum* und *Hordeum vulgare* Pflanzen isolierten Enzyms PhyC, im Vergleich mit dem nativen PhyC ist in Abbildung 46 dargestellt. Der Phytaseaktivitätstest wurde bei Temperaturen zwischen 30 °C und 85 °C mit 5minütiger Inkubationszeit durchgeführt. Die heterolog exprimierte Phytaseproteine weisen ein Temperaturoptimum von ca. 65 °C auf. Die native PhyC hat ein Temperaturoptimum zwischen 70 und 75 °C, wie durch (Idriss, Makarewicz et al. 2002) beschrieben. Bei 65 °C hat die aus *Nicotiana tabacum* aufgereinigte Phytase eine spezifische Aktivität von 21,38 U/mg und die aus *Hordeum vulgare* aufgereinigte PhyC von 21,82 U/mg. Für die native Phytase ist bei 65 °C eine spezifische Aktivität von 66,44 U/mg und bei 75 °C 76,77 U/mg bestimmt worden. Sowohl die aus *Nicotiana tabacum* isolierte Phytase, als auch die aus *Hordeum vulgare* isolierte PhyC zeigt dazu ein um 10 °C verschobenes Temperaturoptimum von ca. 65 °C.





**Abbildung 46:** Vergleich der Temperaturoptima von PhyC aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 (PhyC Ba, blau), *Nicotiana tabacum* (PhyC Nt, braun) und *Hordeum vulgare* (PhyC Hv, grün). Die Phytaseaktivitäten sind als prozentuale Werte dargestellt worden. Die höchste Aktivität ist 100 % gesetzt worden.

Es sind die Thermostabilitäten der rekombinanten Enzyme PhyC aus *Nicotiana tabacum* und *Hordeum vulgare* im Vergleich zum nativen Protein gemessen worden. Die Inkubation der Enzyme erfolgte für 20 min bei Temperaturen zwischen 25-80 °C ohne Substrat und mit 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> als stabilisierenden Zusatz. Danach wurden die Phytaseaktivitäten im Standardverfahren bei 37 °C gemessen. Bis zu einer Temperatur von 50 °C sind alle Enzyme vollständig thermostabil (Abbildung 47). Ab einer Temperatur von 55 °C verhalten sich die rekombinanten PhyC-Proteine weniger thermostabil als die nichtrekombinante Variante. Der Aktivitätsverlust beträgt 30 %. Ab 60 °C verzeichnet auch das native PhyC Protein einen Aktivitätsverlust von ca. 20 %. Vollständig inaktiv sind die Enzyme erst ab einer Temperatur von 80 °C.

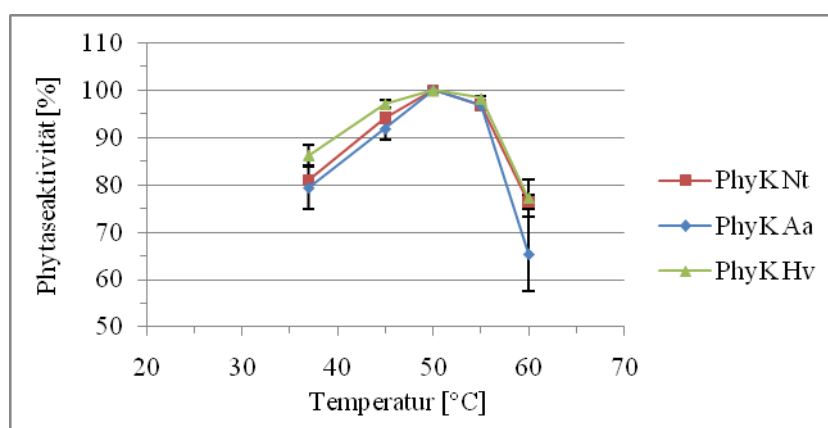


**Abbildung 47:** Thermostabilitätsvergleich von PhyC aus *Bacillus amyloliquefaciens* (PhyC Ba, blau), PhyC aus *Nicotiana tabacum* (PhyC Nt, braun) und *Hordeum vulgare* (PhyC Hv, grün). In der Abbildung ist der Thermostabilitätsverlauf als prozentuale Werte der Phytaseaktivität dargestellt.



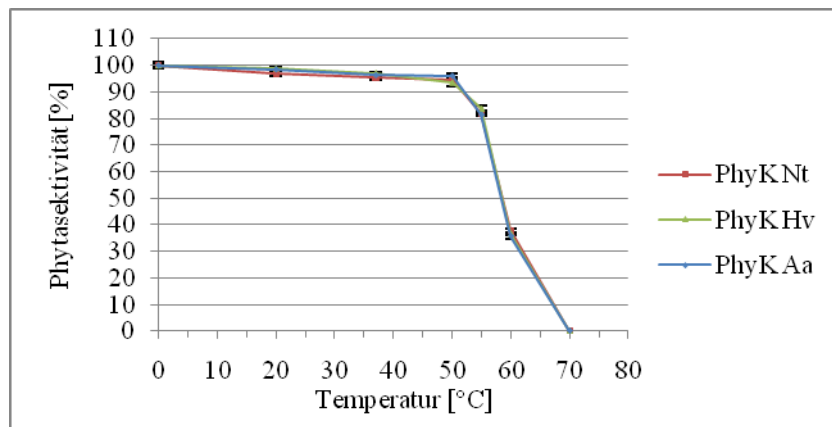
#### 2.1.6.4 Temperaturoptimum und Thermostabilität von PhyK

Es sind die thermischen Eigenschaften der rekombinanten PhyK aus *Nicotiana tabacum*, *Arxula adeninivorans* und *Hordeum vulgare* untereinander verglichen worden. Um die Temperaturoptima zu bestimmen, wurde der Phytaseaktivitätstest bei Temperaturen zwischen 37 °C und 60 °C mit 5minütiger Inkubationszeit durchgeführt (Abbildung 48). Alle drei heterolog exprimierten Proteine haben ihr Temperaturoptimum um 50 °C und zeigen damit das gleiche Temperaturoptimum wie das native Protein (Sajidan, Farouk et al. 2004).



**Abbildung 48:** Vergleich der Temperaturoptima der rekombinanten PhyK aus *Nicotiana tabacum* (PhyK Nt, braun), *Arxula adeninivorans* (PhyK Aa, blau) und *Hordeum vulgare* (PhyK Hv, grün). Die Phytaseaktivitäten sind als prozentuale Werte dargestellt worden. Die höchste Aktivität ist 100 % gesetzt worden.

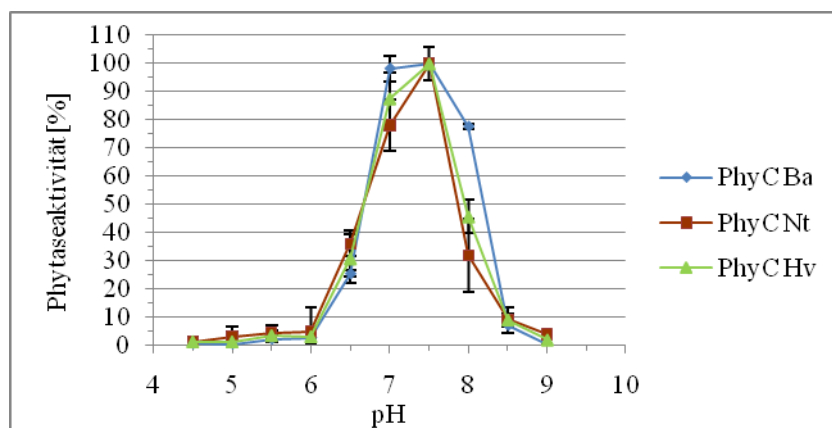
Da die heterologe Expression einen Einfluss auf die Thermostabilität eines Proteins haben kann, wurde diese für die rekombinanten PhyK-Proteine bestimmt (Abbildung 49). Die Inkubation der Enzyme erfolgte für 10 min bei Temperaturen zwischen 0-70 °C ohne Substrat. Danach wurden die Phytaseaktivitäten im Standardverfahren bei 37 °C gemessen. Bis zu einer Temperatur von 50 °C sind alle Enzyme mit ca. 95 % fast vollständig thermostabil. Bei 55 °C haben sie noch eine Phytaseaktivität von 80 %. Über 55 °C findet ein dramatischer Aktivitätsverlust auf unter 40 % Restaktivität statt. Durch Temperaturen zwischen 60 °C und 70 °C wird das Enzym vollständig inaktiviert.



**Abbildung 49:** Vergleich der Thermostabilität von PhyK gereinigt aus *Arxula adeninivorans* (PhyK Aa, blau), *Nicotiana tabacum* (PhyK Nt, braun) und *Hordeum vulgare* (PhyK Hv, grün). Die Phytaseaktivitäten sind als prozentuale Werte dargestellt worden. Die höchste Aktivität ist 100 % gesetzt worden.

### 2.1.6.5 pH-Optimum von PhyC

Die pH-Spektren der rekombinanten Phytasen sind mit dem pH-Verhalten der nativen Phytase verglichen worden. Die Höhe der Phytaseaktivitäten bei pH-Werten zwischen 4,5 und 9 ist in Abbildung 50 aufgeführt. Die Messungen haben keine signifikanten Abweichungen zur gereinigten Phytase aus *B. amyloliquefaciens* FZB45 ergeben. Das pH-Optimum liegt in allen Fällen zwischen pH 7 und 7,5 und stimmt mit den von (Igbasan, Manner et al. 2000) bestimmten Werten überein.

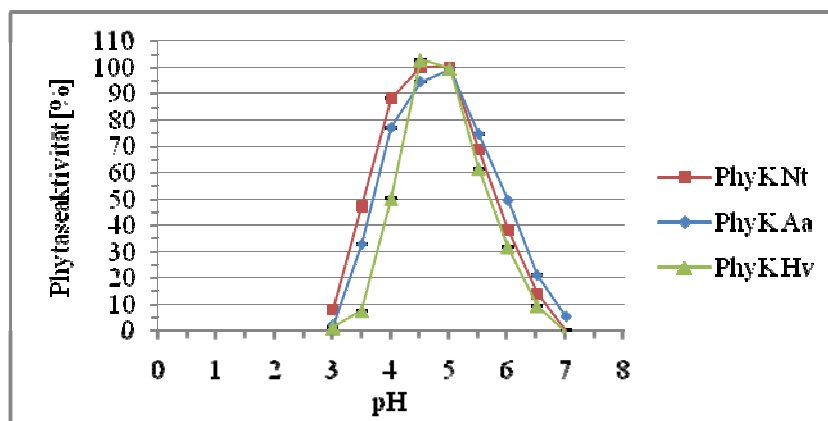


**Abbildung 50:** Vergleich der pH-Optima von PhyC aus FZB45 (PhyC Ba, blau) und rekombinanter PhyC aus *Nicotiana tabacum* (PhyC Nt, braun) und *Hordeum vulgare* (PhyC Hv, grün). Die Phytaseaktivitäten sind als prozentuale Werte dargestellt. Der höchste Wert ist 100 % gesetzt worden.

### 2.1.6.6 pH-Optimum von PhyK

Die Analyse des pH-Verhaltens der rekombinanten Phytasen wurde bei pH-Werten zwischen 3,0 und 7 durchgeführt. ist (Abbildung 51). Das pH-Optimum liegt für alle rekombinanten Proteine zwischen pH 4,5 und 5,0. Es bestehen zwischen den heterolog exprimier-

ten Proteinen und der nativen Phytase keine Unterschiede im pH-Spektrum (Sajidan, Farouk et al. 2004).



**Abbildung 51:** Vergleich der pH-Optima von PhyK aus *Arxula adeninivorans* (PhyK Aa, blau), *Nicotiana tabacum* (PhyK Nt, braun) und *Hordeum vulgare* (PhyK Hv, grün). Die Phytaseaktivitäten sind als prozentuale Werte dargestellt. Die höchste Aktivität ist 100 % gesetzt.

#### 2.1.6.7 Kinetische Parameter von PhyC

Da die aus *Nicotiana tabacum* und *Hordeum vulgare* isolierten Phytasen N-Glykosylierungen in der Nähe des aktiven Zentrums aufweisen, wurden die  $K_m$ -Werte für das Substrat Na-Phytat ermittelt (Tabelle 15). Für das Substrat Na-Phytat zeigen alle Enzyme eine nahezu gleich hohe Affinität gegenüber dem Substrat, da die für die Enzyme ermittelten  $K_m$ -Werte mit 0,107 mM für PhyC aus FZB45, mit 0,0841 mM für PhyC aus *Nicotiana tabacum* und mit 0,0843 mM für PhyC aus *Hordeum vulgare* nahezu übereinstimmen. Unterschiede bestehen in der katalytischen Effizienz, die sich in der Höhe der Enzymwechselzahl (kcat) und dem Quotienten aus kcat/ $K_m$  widerspiegeln. Dabei weist native Phytase mit 1382/min eine höhere Wechselzahl auf als die heterolog exprimierten mit 738/min und 748/min. Auch der Quotient aus kcat/ $K_m$  ist mit 215 deutlich höher.

**Tabelle 15:**  $K_m$ -Werte und spezifische Aktivitäten der PhyC aus *Bacillus amyloliquefaciens* (FZB45), *Nicotiana tabacum* (Nt) und *Hordeum vulgare* (Hv) für Na-Phytat.

PhyC	$K_m$ [mmol/l]	kcat [ $\text{min}^{-1}$ ]	kcat/ $K_m$ [ $\text{min}^{-1} * \text{mmol/l}^{-1}$ ]	Spezif. Aktivität [U/mg]
FZB45	$0,1068 \pm 0,0163$	1382	12900	19,04
Nt	$0,0841 \pm 0,0014$	738	8760	6,76
Hv	$0,0843 \pm 0,0082$	748	8880	6,83

### 2.1.6.8 Kinetische Parameter von PhyK

Die Messungen der  $K_m$ -Werte, der in dieser Arbeit charakterisierten rekombinanten Proteine wurden für Substratkonzentrationen bis 0,6 mmol/l, wie von (Herter 2009) beschrieben, durchgeführt (Tabelle 16). Sie unterscheiden sich nicht signifikant voneinander und stimmen mit den, für die PhyK aus *Arxula adeninivorans* von (Herter 2009) bestimmten Werte, überein. Dabei zeigen die aus den Pflanzen isolierten Proteine eine niedrigere spezifische Aktivität und eine deutlich geringere Enzymwechselzahl von 132/s aus *Nicotiana tabacum* bzw. 325/s aus *Hordeum vulgare*. Die katalytische Effizienz der aus den Pflanzen gereinigten Phytaseproteine ist demzufolge geringer, als die, der aus der Hefe isolierten. Dies stimmt auch mit den Werten der Quotienten aus  $k_{cat}/K_m$  von  $2808 \text{ s}^{-1} * \text{mmol/l}^{-1}$  bzw.  $6771 \text{ s}^{-1} * \text{mmol/l}^{-1}$  überein.

**Tabelle 16:**  $K_m$ -Werte und spezifische Aktivitäten der PhyK aus *Arxula adeninivorans* (Aa), *Nicotiana tabacum* (Nt) und *Hordeum vulgare* (Hv) für Na-Phytat.

PhyK	$K_m$ [mmol/l]	$k_{cat}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$k_{cat}/K_m$ [ $\text{s}^{-1} * \text{mmol/l}^{-1}$ ]	Spezif. Aktivität [U/mg]
<i>Klebsiella sp.</i> (Sajidan, Farouk et al. 2004)	-	-	-	224
<i>E. coli</i> (Sajidan, Farouk et al. 2004)	0,280	66,0	235,71	99
<i>E. coli</i> (Herter 2009; Böhm, Herter et al. 2010)	$0,047 \pm 0,019$	370	7876	380,74
<i>Arxula adeninivorans</i> (Herter 2009)	$0,046 \pm 0,029$	612	13378	481,72
<i>Arxula adeninivorans</i>	$0,046 \pm 0,029$	598	13000	484,02
<i>Nicotiana tabacum</i>	$0,047 \pm 0,035$	132	2808	116,67
<i>Hordeum vulgare</i>	$0,048 \pm 0,033$	325	6771	253,94

### 2.1.7 Wachstumsversuche mit *Nicotiana tabacum* unter P-Mangelbedingungen

Die Möglichkeit der Aufnahme von Phosphor durch die Pflanze ist ein limitierender Faktor für ihr Wachstum und ihre Entwicklung. Die meisten Pflanzen sind nicht in der Lage den Phosphor aus dem Phytat für sich zu nutzen. Zur Untersuchung des Wachstums der

phytasesekretierenden transgenen Pflanzenlinien wurde Na-Phytat als einzige P-Quelle verwendet.

### 2.1.7.1 Vergleich des Wachstums von pMA-P1 und Wildtyp *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun mit Phytat und anorganischem Phosphor als einziger P-Quelle

Für den Wachstumsversuch mit den mit pMA-P1 transformierten *Nicotiana tabacum* Pflanzen wurden die 2 Pflanzenlinien mit der in der T<sub>1</sub>-Generation höchsten Phytaseaktivität verwendet. Der Wachstumsversuch wurde unter unsterilen Bedingungen auf Quarzsand mit Nährlösung die 50 µM Na-Phytat enthielt bei pH 7 durchgeführt. Die Trockenmassen von Spross und Wurzel, die Gesamttrockenmasse sowie das Sproßwurzelverhältniss von 30 Tage lang kultivierten Pflanzen sind in der Tabelle 17 dargestellt. Aus der ihr geht hervor, dass unter den angebotenen Wachstumsbedingungen die transgenen Pflanzen ein besseres Wachstum als der Wildtyp zeigen. Sowohl die Sproß-, die Wurzel-, als auch die Gesamttrockenmasse sind größer als die des Wildtyps und unterscheiden sich signifikant ( $P < 0,05$ ) von dieser. Der Wildtyp hat gegenüber den transgenen Linien eine um bis zu 34 % geringere Sprossbiomasse bei annähernd gleichem Spross-Wurzel-Verhältnis.

**Tabelle 17:** Wachstum mit Phytat als einziger P-Quelle bei pH 7. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (pMA-P1 n=4; Wildtyp Nt n=20). Die mit Sternsymbolik \* gekennzeichneten Werte unterschieden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) von denen des Wildtyps. Das Spross-Wurzelverhältnis ist nicht unterschiedlich.

GENOTYP	TROCKENGEWICHT SPROSS [G]	TROCKENGEWICHT WURZEL [G]	GESAMT-TROCKENGEWICHT [G]	SPROSS-WURZEL-VERHÄLTNIS
pMA-P1 2	0,47 $\pm$ 0,08*	0,33 $\pm$ 0,12*	0,8 $\pm$ 0,14*	1,42 $\pm$ 0,45
pMA-P1 3	0,47 $\pm$ 0,10*	0,25 $\pm$ 0,07*	0,72 $\pm$ 0,17*	1,88 $\pm$ 0,13
Nt	0,31 $\pm$ 0,07	0,17 $\pm$ 0,07	0,48 $\pm$ 0,12	1,82 $\pm$ 0,47

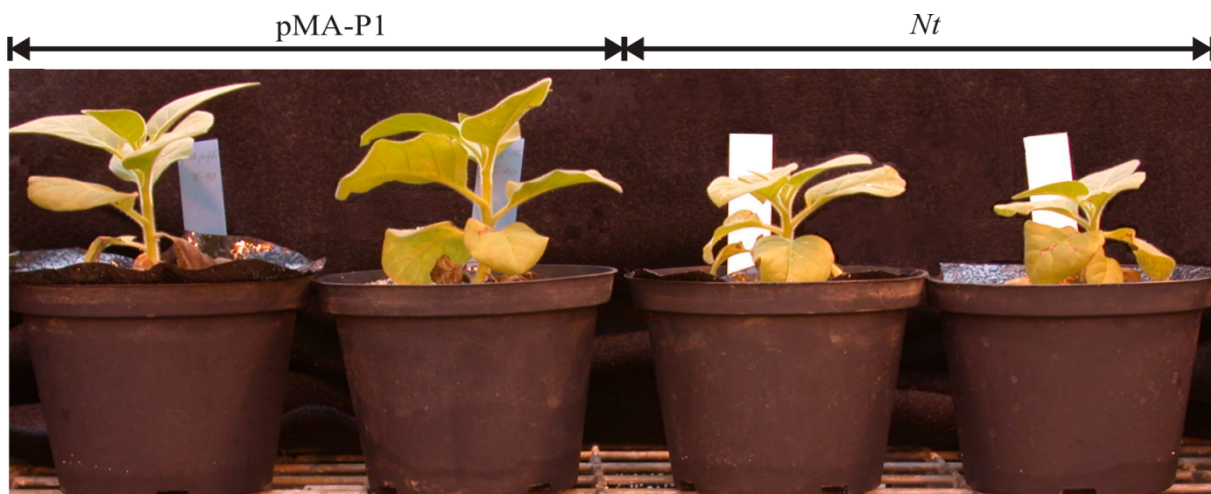
Im gleichen Zeitraum wurde parallel ein Wachstumsversuch auf Quarzsand mit Nährlösung, die 150 µM anorganisches Phosphat enthalten hat, durchgeführt (Tabelle 18). Die Pflanzen zeigen auf anorganischem Phosphat ein besseres Wachstum als auf Na-Phytat. Bezogen auf die Gesamttrockenmasse ist die Biomasseproduktion mit anorganischem Phosphat beim Wildtyp 3,5mal höher als auf Phytat. Bei den transgenen Linien ist die Biomasse mit anorganischem Phosphat 2,6 bzw. 2,4mal höher als auf Phytat. Setzt man die Gesamttrockenmasse des Wachstums mit anorganischem Phosphat auf 100 % weist im

Vergleich dazu die Biomasseproduktion mit Phytat signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und transgenen Linien auf. Für die Linie pMA-P1 2 beträgt das Wachstum auf Phytat 38 %, für die Linie pMA-P1 3 42 % und für den Wildtyp 28 %.

**Tabelle 18:** Wachstum mit  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  als einziger P-Quelle bei pH 7. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (pMA-P1 n=4; Wildtyp Nt n=20).

GENOTYP	TROCKENGEWICHT SPROSS [G]	TROCKENGEWICHT WURZEL [G]	GESAMT-TROCKENGEWICHT [G]	SPROSS-WURZEL-VERHÄLTNIS
pMA-P1 2	1,11 $\pm$ 0,23	0,98 $\pm$ 0,38	2,09 $\pm$ 0,52	1,31 $\pm$ 0,53
pMA-P1 3	1,10 $\pm$ 0,31	0,63 $\pm$ 0,19	1,73 $\pm$ 0,32	1,76 $\pm$ 0,65
Nt	1,14 $\pm$ 0,29	0,54 $\pm$ 0,13	1,69 $\pm$ 0,42	2,10 $\pm$ 0,11

In der Abbildung 52 sind die 30 Tage auf Phytat gewachsenen Pflanzen der transgenen Linien im Vergleich mit dem Wildtyp dargestellt. Wie schon die Meßergebnisse der Trockenmassen erkennen lassen, sind die Pflanzen der transgenen Linien größer als die des Wildtyps.



**Abbildung 52:** Wachstumsversuch *Nicotiana tabacum* pMA-P1 auf Sand mit Phytat als einziger P-Quelle. Vergleich 30 Tage alter auf Quarzsand mit Phytat-haltiger Nährlösung gegossener Pflanzen mit (pMA-P1) und ohne (*Nt*) *phyC*.

#### 2.1.7.2 Vergleich des Wachstums von pMA-R1 und Wildtyp *Nicotiana tabacum* L cv. Samsun mit Phytat und anorganischem Phosphor als einziger P-Quelle

Für den Wachstumsversuch mit den mit pMA-R1 transformierten *Nicotiana tabacum* Pflanzen wurden die 2 Pflanzenlinien mit der in der  $T_1$ -Generation höchsten Phytaseaktivität verwendet. Der Wachstumsversuch wurde unter unsterilen Bedingungen auf Quarzsand mit Nährlösung die 50  $\mu\text{M}$  Na-Phytat enthielt bei pH 5 durchgeführt. Die

Trockenmassen von Spross und Wurzel, die Gesamttrockenmasse sowie das Spross-Wurzel-Verhältnis von 30 Tage lang kultivierten Pflanzen sind in der Tabelle 19 dargestellt. Unter den angebotenen Wachstumsbedingungen zeigen die transgenen Pflanzen keine signifikanten Unterschiede im Wachstum mit Phytat im Vergleich zum Wildtyp. Sowohl die Sproß-, die Wurzel-, als auch die Gesamttrockenmasse sind mit denen des Wildtyps vergleichbar.

**Tabelle 19:** Wachstum mit Phytat als einziger P-Quelle bei pH 5. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (pMA-R1 n=10; Wildtyp Nt n=8). Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und transgenen Linien.

GENOTYP	TROCKENGEWICHT SPROSS [G]	TROCKENGEWICHT WURZEL [G]	GESAMT-TROCKENGEWICHT [G]	SPROSS-WURZEL-VERHÄLTNIS
pMA-R1 49	0,64 $\pm$ 0,24	0,24 $\pm$ 0,12	0,88 $\pm$ 0,34	2,85 $\pm$ 0,51
pMA-R1 54	0,77 $\pm$ 0,22	0,24 $\pm$ 0,08	1,02 $\pm$ 0,30	3,20 $\pm$ 0,38
Nt	0,67 $\pm$ 0,22	0,21 $\pm$ 0,08	0,89 $\pm$ 0,30	3,23 $\pm$ 0,31

Im gleichen Zeitraum wurde parallel ein Wachstumsversuch auf Quarzsand mit Nährlösung, die 250  $\mu$ M anorganischem Phosphat enthalten hat, durchgeführt (Tabelle 20). Die Pflanzen zeigen auf anorganischem Phosphat ein besseres Wachstum als auf Na-Phytat. Bezogen auf die Gesamttrockenmasse ist die Biomasseproduktion mit anorganischem Phosphat beim Wildtyp 2,5mal höher als mit Phytat. Bei den transgenen Linien ist die Biomasse mit anorganischem Phosphat 2,2 bzw. 2,8mal höher als auf Phytat. Setzt man die Gesamttrockenmasse des Wachstums mit anorganischem Phosphat auf 100 % beträgt im Vergleich dazu die Biomasseproduktion mit Phytat für die Linie pMA-R1 49 46 %, für die Linie pMA-R1 54 36 % und für den Wildtyp 41 %.

**Tabelle 20:** Wachstum mit  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  als einziger P-Quelle bei pH 5. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (pMA-R1 n=10; Wildtyp Nt n=8).

GENOTYP	TROCKENGEWICHT SPROSS [G]	TROCKENGEWICHT WURZEL [G]	GESAMT-TROCKENGEWICHT [G]	SPROSS-WURZEL-VERHÄLTNIS
pMA-R1 49	1,52 $\pm$ 0,90	0,39 $\pm$ 0,21	1,91 $\pm$ 1,10	3,85 $\pm$ 0,88
pMA-R1 54	2,36 $\pm$ 0,55	0,48 $\pm$ 0,11	2,84 $\pm$ 0,64	5,05 $\pm$ 0,94
Nt	1,82 $\pm$ 0,61	0,37 $\pm$ 0,12	2,19 $\pm$ 0,73	4,90 $\pm$ 0,44

## 2.1.8 Wachstumsversuche mit *Hordeum vulgare*

### 2.1.8.1 Vergleich des Wachstums von *phyC<sub>cop</sub>PSP* und *phyC<sub>cop</sub>OxOA* und *Hordeum vulgare* L. cv. Golden Promise mit Phytat bzw. $\text{KH}_2\text{PO}_4$ als einziger P-Quelle

Für den Wachstumsversuch wurden transgene Pflanzen der Linien *phyC<sub>cop</sub>PSP* und *phyC<sub>cop</sub>OxOA* verwendet, die ein apoplastisches Signalpeptid aufweisen. Es wurden die Linien der Konstrukte der T<sub>1</sub>-Generation verwendet, die die höchste Phytaseaktivität aufweisen. Der Wachstumsversuch wurde unter unsterilen Bedingungen auf Quarzsand mit 20 mg/kg Phosphorzugabe in Form von Na-Phytat bzw.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  durchgeführt. Der pH-Wert des Bodens wurde mit 7,3 ermittelt. Es wurden die Trockenmassen von Spross und Wurzel, die Gesamttrockenmasse, das Spross-Wurzel-Verhältnis sowie der Phosphorgehalt im Sproß von 30 Tage lang kultivierten Pflanzen bestimmt (Tabelle 21). Zwischen den beiden P-Quellen bestehen signifikante Unterschiede in der Biomasseproduktion. So ist die Biomasse des Wildtyps auf  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  fast doppelt so hoch wie auf Na-Phytat. Auch der Phosphorgehalt im Spross der mit anorganischem Phosphat gewachsenen Pflanzen ist fast 2,5mal höher als mit Na-Phytat als P-Quelle. Innerhalb der mit Na-Phytat gewachsenen Pflanzen bestehen, sowohl in der Biomasse, als auch beim Spross-Wurzel-Verhältnis keine signifikanten Unterschiede zwischen transgenen Linien und Wildtyp. Auch die Phosphorgehalte im Spross unterscheiden sich nicht.

**Tabelle 2 1:** Wachstumsversuch von transgenen *Hordeum vulgare* Linien (*phyC<sub>cop</sub>*) und *Hordeum vulgare* Wildtyp mit verschiedenen P-Quellen. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (*phyC<sub>cop</sub>* n=3; Wildtyp Hv n=3).

GENO-TYP	P-QUELLE	TROCKEN-GEWICHT SPROSS [G]	TROCKEN-GEWICHT WURZEL [G]	GESAMT-TROCKEN-GEWICHT [G]	SPROSS-WURZEL-VERHÄLTNIS	P-GEHALT IM SPROSS [MG/G]
<i>phyC<sub>cop</sub>OxOA</i>	Na-Phytat	1,07 $\pm$ 0,15	1,11 $\pm$ 0,19	2,18 $\pm$ 0,42	0,96 $\pm$ 0,06	0,23 $\pm$ 0,02
<i>phyC<sub>cop</sub>PSP</i>	Na-Phytat	1,01 $\pm$ 0,24	0,85 $\pm$ 0,16	1,86 $\pm$ 0,31	1,19 $\pm$ 0,17	0,21 $\pm$ 0,00
Hv	Na-Phytat	1,08 $\pm$ 0,16	1,03 $\pm$ 0,22	2,11 $\pm$ 0,36	1,05 $\pm$ 0,19	0,21 $\pm$ 0,01
Hv	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,90 $\pm$ 0,17	2,24 $\pm$ 0,10	4,14 $\pm$ 0,27	0,85 $\pm$ 0,04	0,50 $\pm$ 0,01

Desweiteren wurde eine Analyse der Wurzel mit Hilfe des Programms WinRhizo Pro 2005b (Regent Instruments Inc.) durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Bei der Gesamtwurzellänge, der spezifischen Wurzellänge und dem durchschnittlichen Wurzeldurchmesser sind keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp feststellbar.



### 2.1.8.2 Vergleich des Wachstums von *phyKPSP* und Wildtyp *Hordeum vulgare* L. cv. Golden Promise mit Phytat bzw. $\text{KH}_2\text{PO}_4$ als einziger P-Quelle

Transgene Pflanzen der Linien *phyKPSP* wurden für den Wachstumsversuch verwendet. Es wurde die Linie der  $T_1$ -Generation benutzt, die die höchste Phytaseaktivität aufweist. Der Wachstumsversuch wurde analog dem mit den Linien *phyC<sub>cop</sub>* auf Quarzsand mit 20 mg/kg Phosphorzugabe in Form von Na-Phytat bzw.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  durchgeführt. Der pH-Wert des Quarzsandes hat 5,3 betragen. Es wurden die Trockenmassen von Spross und Wurzel, die Gesamttrockenmasse, das Spross-Wurzel-Verhältnis sowie der Phosphorgehalt im Sproß von 30 Tage lang kultivierten Pflanzen bestimmt. Wie aus der Tabelle 22 hervorgeht, bestehen zwischen den beiden P-Quellen signifikante Unterschiede in der Biomasseproduktion der Pflanzen. So ist die Biomasse des Wildtyps auf  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,4mal so hoch wie auf Na-Phytat. Der Phosphorgehalt im Spross der mit anorganischem Phosphat gewachsenen Pflanzen ist doppelt so hoch wie mit Na-Phytat als P-Quelle. Innerhalb der mit Na-Phytat gewachsenen Pflanzen bestehen, sowohl in der Biomasse, als auch beim Spross-Wurzel-Verhältnis keine signifikanten Unterschiede zwischen transgenen Linien und Wildtyp. Auch die Phosphorgehalte im Spross unterscheiden sich nicht.

**Tabelle 22:** Wachstumsversuch von transgenen *Hordeum vulgare* Linien (*phyK*) und *Hordeum vulgare* Wildtyp mit verschiedenen P-Quellen. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (*phyK* n=3; Wildtyp Hv n=3).

GENO-TYP	P-QUELLE	TROCKEN-GEWICHT SPROSS [G]	TROCKEN-GEWICHT WURZEL [G]	GESAMT-TROCKEN-GEWICHT [G]	SPROSS-WURZEL-VERHÄLTNIS	P-GEHALT IM SPROSS [MG/G]
<i>phyK</i> PSP	Na-Phytat	1,19 $\pm$ 0,20	1,56 $\pm$ 0,03	2,74 $\pm$ 0,21	0,76 $\pm$ 0,17	0,24 $\pm$ 0,03
Hv	Na-Phytat	1,15 $\pm$ 0,05	1,51 $\pm$ 0,13	2,66 $\pm$ 0,09	0,76 $\pm$ 0,09	0,25 $\pm$ 0,01
<i>phyK</i> PSP	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2,00 $\pm$ 0,20	2,24 $\pm$ 0,51	4,24 $\pm$ 0,58	0,89 $\pm$ 0,27	0,50 $\pm$ 0,20
Hv	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,71 $\pm$ 0,26	2,08 $\pm$ 0,32	3,79 $\pm$ 0,45	0,82 $\pm$ 0,23	0,53 $\pm$ 0,01
Hv	P <sup>-</sup>	0,93 $\pm$ 0,10	0,92 $\pm$ 0,12	1,85 $\pm$ 0,20	1,01 $\pm$ 0,10	0,21 $\pm$ 0,01

Die zu den Linien von *phyC<sub>cop</sub>* analog durchgeführten Analysen der Wurzel haben auch für *phyK* keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf den Wildtyp ergeben.



### 3 Diskussion

In dieser Arbeit konnten zwei, in ihren biochemischen Eigenschaften unterschiedliche bakterielle Phytasen, in zwei verschiedenen pflanzlichen Wirtsorganismen erfolgreich exprimiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Proteine in verschiedenen Geweben des Wirtes vorliegen und dass sie sekretiert werden. Desweiteren konnte für jedes Protein wirtsspezifisch eine Reinigungsstrategie entwickelt und die biochemischen Eigenschaften der rekombinanten Proteine mit denen der nativen Proteine verglichen werden. Weiterhin konnte belegt werden, dass die *Nicotiana tabacum* Expressionslinien mit der  $\beta$ -Propeller-Phytase einen Wachstumsvorteil unter unsterilen Bedingungen auf Quarzsand mit Na-Phytat als einziger P-Quelle haben. Durch die HPIC-Analyse der Samen von *Hordeum vulgare* konnte nachgewiesen werden, dass die Expressionslinien mit der sauren Histidin-Phytase einen reduzierten Phytinsäuregehalt aufweisen.

Zuerst sollen die Effekte der heterologen Expression und die Änderungen der biochemischen Eigenschaften der rekombinanten Phytasen diskutiert werden. Ein weiterer Diskussionsschwerpunkt soll der Einfluss der genetischen Veränderung auf die Phosphorzusammensetzung der Samen von *Hordeum vulgare* sein. Anschließend soll die Auswirkung der Expression der Phytasen auf das Pflanzenwachstum erörtert werden.

#### 3.1 Heterologe Expression von *phyC* und *phyK*

##### 3.1.1 Expression in *Nicotiana tabacum*

Bei der Durchführung der heterologen Genexpression stellen sich u.a. die Fragen, wie hoch das Expressionslevel des jeweiligen Proteins ist, ob das Protein an den gewünschten Ort innerhalb der Pflanze transportiert wird und ob sich seine biochemischen Eigenschaften gegenüber dem nativen Protein verändern. Die Expressionshöhe heterologer Proteine in pflanzlichen Systemen ist unterschiedlich. Sie ist abhängig von Faktoren, wie z.B. der Wahl des Promotors, der Codonusage, dem Targeting und der Stabilität des Proteins. Düring et al. produzierten in *Nicotiana tabacum* einen epidermalen menschlichen Wachstumsfaktor mit einem Anteil von 0,001 % am gesamten löslichen Protein (During, Hippe et al. 1990). Verwoerd et al. zeigten, dass eine in den extrazellulären Raum transportierte *Aspergillus niger* Phytase in den Blättern von *Nicotiana tabacum* bis zu einem Anteil von 14,4 % am gesamten löslichen Protein akkumulierte (Verwoerd, van Paridon et al. 1995). Eine Phytase aus *Bacillus subtilis* 168 wurde von Chan et al. in *Nicotiana tabacum* mit einer

Höhe von 0,4 % exprimiert (Chan, Lung et al. 2006). Zang et al. berichteten die höchste Akkumulation für eine saure Histidinphosphatase, einer Phytase aus *Aspergillus ficuum*, mit einem 17,6 % Anteil am gesamten löslichen Protein in Tabak (Zhang, An et al. 2005). Allgemein erwartet man bei der heterologen Genexpression einen Anteil des heterologen Proteins am gesamten löslichen Protein zwischen 0,1 % und 1 % (Abranches, Marcel et al. 2005).

In dieser Arbeit konnte ein Anteil von 1,1 % bis 1,6 % für PhyC und 0,1 bis 0,25 % für PhyK am gesamten löslichen Protein in den Blättern von *Nicotiana tabacum* L. erzielt werden (Abbildung 26). Damit entspricht die Expressionshöhe denen allgemein in der Literatur berichteten für heterologe Proteine in Pflanzen. Die Expressionshöhe von PhyC ist bis zu 4mal höher als die von Chan et al. für die *Bacillus subtilis* 168 Phytase berichtete.

Da sich beide Konstrukte nur in der Gensequenz der Phytase unterscheiden, ist die geringere Ausbeute an PhyK vermutlich auf den hohen GC-Gehalt des Gens von 65,7 % (Abbildung 15) und seine für *Nicotiana tabacum* ungünstige Codonnutzung (Abbildung 17) zurückzuführen. Der CAI für *phyK* bezogen auf *Nicotiana tabacum* beträgt 0,58. Die Gensequenz von PhyC hingegen ist in ihrer Codonnutzung und ihrem GC-Gehalt deutlich besser an die von *Nicotiana tabacum* angepasst. Sie hat nur einen GC-Gehalt von 46,7 % und einen CAI von 0,75 bezogen auf *Nicotiana tabacum*. Dies schlägt sich in einer bis zu 6mal höheren Expression des Proteins nieder. Die Ergebnisse der transienten Expression zeigen, dass die Tendenz der niedrigeren Expressionshöhe von *phyK* im Vergleich zu *phyC* nicht auf einen Positionseffekt zurückführbar sind, da der Anteil an PhyC am gesamten löslichen Protein nach 42 h ca. 0,42 % erreicht, während er zum selben Zeitpunkt für PhyK bei 0,059 % liegt. Dies entspricht in der Tendenz den später bei der stabilen Integration erreichten Werten in den Blättern.

Da Untersuchungen des Signalpeptids mit dem Gus-Reportergen eindeutig nachgewiesen haben, dass das Signalpeptid ein apoplastisches ist (Borisjuk, Borisjuk et al. 1999), kann man davon ausgehen, dass die rekombinanten Proteine, PhyC und PhyK, in den Apoplasten transportiert werden und dort akkumulieren. Ihre Lokalisation im extrazellulären Raum konnte mit Hilfe der von Verwoerd et al. beschriebenen Methode nachgewiesen werden (Verwoerd, van Paridon et al. 1995). Die Phytaseaktivitäten von PhyC in den extrazellulären Extrakten sind bis zu 69mal höher, als in den Gesamtproteinextrakten der Blätter. Für PhyK erreichen die Aktivitäten im Apoplasten bis zu 52fach höhere Werte (Tabelle 4).

Wie bei Genen unter der Kontrolle des 35S-CaMV-Promotors zu erwarten, finden sich die Genprodukte nicht nur in den Blättern, sondern auch in den Wurzeln der transgenen Pflanzen wieder (Odell, Nagy et al. 1985). Dies konnte sowohl für PhyC, als auch für PhyK gezeigt werden (Abbildung 24B und Abbildung 25B). Desweiteren wird die Sekretion aus den Wurzeln in die Nährlösung für die Phytasen in *Nicotiana tabacum* nachgewiesen (Abbildung 24D und Abbildung 25D). In der Nährlösung findet dann eine Anhäufung der Proteine statt. Damit folgen die Ergebnisse der von Borisjuk et al. beschriebenen Rhizosekretion, bei der die rekombinanten, in den extrazellulären Raum transportierten Proteine, kontinuierlich durch die Wurzel sekretiert werden (Borisjuk, Borisjuk et al. 1999).

### 3.1.2 Expression in *Hordeum vulgare*

Die Expression von heterologen Proteinen in *Hordeum vulgare* stellt andere Ansprüche bezüglich der Codonzusammensetzung, der Wahl des Promotors und der Signalpeptide. Der häufig zur Expression in *Nicotiana tabacum* genutzte 35S-CaMV-Promotor ist zwar in *Hordeum vulgare* funktionell, aber die Expressionshöhe ist 10mal geringer, als z.B. die des Ubiquitinpromotors aus Mais (Christensen, Sharrock et al. 1992). Der GC-Gehalt von Genen aus *Hordeum vulgare* und anderen Getreiden ist im Durchschnitt weitaus höher, als der von Tabak. Besonders in der dritten Position der Triplets unterscheidet sich der GC-Gehalt besonders stark.

Deshalb kann es für den Erfolg der Expression heterologer Gene notwendig sein, diese in ihrer Codonnutzung anzupassen. Einen Beweis dafür lieferten Jensen et al., als sie eine Hybrid  $\beta$ -Glucanase, zusammengesetzt aus einer *Bacillus*  $\beta$ -Glucanase und einer *Hordeum vulgare*  $\beta$ -Glucanase, in Gerste exprimierten. Von den zwei Varianten, codonoptimiert und nicht codonoptimiert war nur die Expression der codonoptimierten Glucanase detektierbar (Jensen, Olsen et al. 1996). Horvath et al. zeigten, dass mit einem anderen Promotor und Signalpeptid das gleiche Hybrid ohne Codonanpassung an *Hordeum vulgare*, nur in sehr geringem Maße, mit einem Anteil von ca. 0,02 % am gesamten löslichen Protein, produziert wurde. Wohingegen die codonangepasste Variante, mit Anhebung des GC-Gehaltes der Triplets auf 63 %, einen Anteil von bis zu 4 % aufwies (Horvath, Huang et al. 2000).

Aus oben genannten Gründen wurde in dieser Arbeit wegen des niedrigen GC-Gehaltes des *phyC*-Gens, dieses in seinem GC-Gehalt auf 63 % angehoben, und unter Kontrolle des Ubiquitinpromotors aus Mais, in *Hordeum vulgare* exprimiert. Wie bei der Expression mit

dem 35S-CaMV-Promotor in Tabak, sind auch bei der Expression mit dem Ubiquitinpromotor in Gerste, die Genprodukte in allen Organen der Pflanze zu finden (Takimoto, Christensen et al. 1994). PhyC und PhyK konnten sowohl im Blatt, der Wurzel, als auch in den Samen der transgenen Linien nachgewiesen werden (Abbildung 29 und Abbildung 30). Sowohl für das Signalpeptid PSP, als auch für OxOA, konnte die Sekretion von PhyC in die Nährlösung nach 24 h sichtbar gemacht werden. Eine Akkumulation des Genproduktes in der Nährlösung über mehrere Tage konnte nicht festgestellt werden. Dies ist möglicher Weise auf den Abbau des rekombinanten Proteins durch Proteasen zurückzuführen. Ein Hinweis darauf ist das Vorhandensein mehrerer Banden im Westernblot (Abbildung 29 D), vor allem der Bande um 20 kDa und 10 kDa, die Abbauprodukte der Phytase darstellen könnten. Der Wildtyp weist keine dieser Banden im Blot aus.

Für PhyK, mit dem PSP-Signalpeptid, war ebenfalls eine Sekretionsbande nach 24 h nachweisbar (Abbildung 30 D). Diese zeigte sich auch noch nach 6 und 9 Tagen. PhyK war, nach Untersuchungen von Elkhail et al., im Gegensatz zu PhyC, stabiler gegenüber proteolytischem Abbau (Elkhail). Da der Sekretionsversuch für Gerste im Gegensatz zu Tabak unter unsterilen Bedingungen erfolgte, ist es möglich, dass die Proteasen nicht nur von der Pflanze selbst, sondern auch von Pilzen oder Bakterien stammen.

Da Horvath et al. berichteten, dass das Signalpeptid auch einen Einfluss auf die Expressionshöhe hat, wurde *phyC<sub>cop</sub>* mit verschiedenen Signalpeptiden ausgerüstet. Der Anteil von PhyC mit Signalpeptid PSP am gesamten löslichen Protein beträgt 1,0 % und ist damit ähnlich so hoch wie die Expression von PhyC in Tabak (Abbildung 31). Mit dem Signalpeptid der Oxalatoxidase (OxOA) verdoppelt sich der Gehalt an PhyC in den Blättern. Ebenso gilt dies für die eine der Expressionslinien mit dem Chitinasesignalpeptid (Chi 26 1). Die zweite Expressionslinie, mit dem gleichen Signalpeptid, hat nur einen Anteil von 0,8 %. Die saure Phytase PhyK aus *Klebsiella* sp. verfügt über einen hohen GC-Gehalt von 65,7 % (Abbildung 15) und einen CAI bezogen auf Gerste von 0,83. Für sie konnte ein Anteil von bis zu 0,36 % am gesamten löslichen Protein im Blatt nachgewiesen werden (Abbildung 31).

Trotzdem ist der Anteil von PhyK am löslichen Gesamtprotein, im Vergleich zur *PhyC<sub>cop</sub>* mit gleichem Signalpeptid und identischem Promotor, fast 3mal geringer. Dies wäre mit einer fehlenden Codonoptimierung erklärbar, denn in der Gensequenz befindet sich an Position 234 das von *Hordeum vulgare* am seltensten genutzte Codon UUA (Abbildung 16). In Kombination mit dem starken Ubiquitinpromotor könnte diese Tatsache zu einer Ver-

knappung an dazugehöriger tRNA führen und damit die Expressionshöhe negativ beeinflussen. Desweiteren könnte ein Positionseffekt, bedingt durch die Transformation mit *Agrobacterium*, Ursache für das niedrigere Expressionslevel sein.

### 3.1.3 Vergleich der rekombinanten PhyC-Proteine mit dem nativen Protein aus *Bacillus amyloliquefaciens*

Die Untersuchungen der biochemischen Eigenschaften der rekombinanten PhyC-Proteine haben ergeben, dass die spezifischen Aktivitäten, der aus *Nicotiana tabacum* aufgereinigten Phytase um 64,5 %, und die der aus *Hordeum vulgare* aufgereinigten um 64,1 % im Vergleich zur nativen Phytase sinken. Die in dieser Arbeit für die rekombinanten PhyC-Proteine bestimmten spezifischen Aktivitäten (Tabelle 15) sind trotz Aktivitätsverlusts mehr als 3mal höher als die von Chan et al. in *Nicotiana tabacum* exprimierte *Bacillus subtilis* 168 Phytase.

Der Aktivitätsverlust ist nicht auf die Art der Reinigung zurückführbar, da für die Reinigung von PhyC aus *Nicotiana tabacum* das gleiche Verfahren angewandt wurde, wie für das native Protein, und das Reinigungsverfahren von PhyC aus Gerste von den beiden anderen abwich.

Auffällig ist das unterschiedliche Laufverhalten der beiden rekombinanten Proteine gegenüber dem nativen Protein im SDS-Gel (Abbildung 9). Die transiente Expression in Tabak zeigt sowohl ein Phytaseprotein mit der Masse der nativen Phytase, als auch ein langsamer wanderndes Phytaseprotein. Die aus Tabak gereinigte PhyC weist eine Massenzunahme von 9,4 kDa, und die PhyC aus Gerste von bis zu 12,4 kDa, gegenüber der nativen Phytase auf (Abbildung 38 und Abbildung 39).

Da Pflanzen, im Gegensatz zu *Bacillus amyloliquefaciens*, die Fähigkeit besitzen Proteine zu glykosylieren, ist die Massenzunahme mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine Glykosylierung von PhyC zurückzuführen. Beide Signalpeptide (PSP und OxOA) sind funktionell für einen Transport des Proteins in den Apoplasten (Borisjuk, Borisjuk et al. 1999). Durch die signalpeptidvermittelte Translokation gelangt das Protein in das Endoplasmatische Retikulum oder über dieses weiter in den Golgiapparat. Sowohl im Endoplasmatischen Retikulum, als auch im Golgiapparat könnte eine N- bzw. O-Glykosylierung erfolgt sein.

Die angestellten Berechnungen potentieller Glykosylierungsstellen in der Aminosäuresequenz von PhyC haben ergeben, dass drei potentielle N-Glykosylierungsstellen vorliegen.

Die N-Glykosylierung findet an einem Asparaginrest des Aminosäuremotifs Asn-X-Thr/Ser durch Übertragung einer Polysaccharidkette auf diesen statt.

Sowohl die PAS-Färbung (Abbildung 43) als auch die transiente Expression mit Tunicamycin (Abbildung 44 A) haben den Nachweis erbracht, dass PhyC glykosyliert vorliegt. Da das Tunicamycin erst 48 h nach der Infiltration und damit nach Expressionsbeginn zugesetzt wurde, liegen sowohl vollständig glykosylierte als auch nur teilweise glykosylierte Formen des Proteins vor. Es konnte so die N-Glykosylierung für zwei Positionen nachgewiesen werden. Vermutlich ist auch die dritte Position glykosyliert, da die Massen der unter Tunicamycineinfluss entstandenen Proteinbanden, ca. 47 kDa und 45 kDa betragen, die native Phytase dagegen eine Masse von 41 kDa aufweist.

Die Glykosylierung hat einen Einfluss auf die Thermostabilität und auf das Temperaturoptimum von Proteinen. Die meisten Proteine besitzen in glykosylierter Form eine verbesserte Thermostabilität. Es gibt allerdings auch umgekehrte Beispiele.

Einen Hinweis darauf, dass nicht alle Proteine durch Glykosylierung thermostabiler werden, haben Meldgaard und Svendsen mit ihren Untersuchungen an verschiedenen in *Saccharomyces cerevisiae* exprimierten Hybridmolekülen von *Bacillus*  $\beta$ -Glucanasen gegeben (Meldgaard and Svendsen 1994). Der Grad der Verbesserung der Thermostabilität durch die Glykosylierung in den Hefezellen schwankte. Die  $\beta$ -Glucanase aus *Bacillus amyloliquefaciens* zeigte, in den von ihnen angestellten Untersuchungen, eine stärkere Erhöhung ihrer Thermostabilität als die *Bacillus macerans*  $\beta$ -Glucanase. Bei einem der fünf Hybride aus *B. amyloliquefaciens* und *B. macerans* war die unglykosylierte Form thermostabiler als die glykosylierte.

Ein weiteres Beispiel haben Tull et al. veröffentlicht. Sie produzierten eine rekombinante alkalophile *Bacillus*  $\alpha$ -Amylase in *Pichia pastoris*. Diese wies eine um 13 °C reduzierte Thermostabilität gegenüber ihrer unglykosylierten in *Bacillus* hergestellten Form auf (Tull, Gottschalk et al. 2001).

Belcarz et al. isolierten zwei verschiedene Varianten einer extrazellulären Invertase von *Candida utilis*. Sie wiesen eine unglykosylierte thermostabilere und eine glykosylierte weniger thermostabile Variante nach. Die glykosylierte Form zeigte eine um 42 % reduzierte spezifische Aktivität gegenüber der unglykosylierten Form (Belcarz, Ginalska et al. 2002).



Auch bei der hier untersuchten rekombinanten *Bacillus* Phytase tritt eine Verschiebung des Temperaturoptimums (Abbildung 46) von 75 °C auf 65 °C und ein Verlust an Thermostabilität von ca. 5 °C auf (Abbildung 47). Die spezifische Aktivität sinkt von 19,04 U/mg auf 6,76 U/mg bzw. 6,83 U/mg. Dies deutet darauf hin, dass sich die Glykosylierungen in der Nähe von Aminosäureresten befinden, die für die Substratbindung des Phytats verantwortlich sind.

Oh et al. und Ha et al. wiesen für eine zu 98 % in ihrer Aminosäuresequenz zu PhyC identischen *Bacillus amyloliquefaciens* DS11 Phytase nach, dass für die Aktivität und die Stabilität des Enzyms Calcium essentiell ist (Ha, Oh et al. 2000). Die Kristallisationsstudien von Ha et al. zeigten, dass es drei Calciumbindestellen im aktiven Zentrum und drei weitere ausserhalb existieren. Oh et al. bewiesen, dass die Aminosäuren der Positionen K 76, K 77, R 122 und K 179 eine elektrostatisch günstige Umgebung für die Bindung des Phytats an das aktive Zentrum der Phytase bilden (Oh, Chang et al. 2001). Die Glykosylierungsstelle an der Position N 121 liegt gleich neben dem Argininrest R122, bei dessen Austausch Oh et al. eine Reduktion der Phytaseaktivität um 50 % beobachteten. Die anderen Glykosylierungsstellen sind innerhalb der Struktur weit von den für die Substratbindung wichtigen Aminosäureresten entfernt. Sie haben möglicherweise einen Einfluss auf die Calciumbindestellen und damit auf die Thermostabilität.

Unsere kinetischen Studien mit Na-Phytat haben ergeben, dass die rekombinanten PhyC-Proteine zwar in ihrer spezifischen Aktivität eingeschränkt sind, aber ihre Affinität zum Substrat erhalten geblieben ist. Zwischen dem nativen und den rekombinanten Enzymen konnte nur ein Unterschied in der Wechselzahl festgestellt werden. So betrug  $k_{cat}$  für das native Protein 1382/min und für die rekombinanten Enzyme ca. 740/min (Tabelle 15). Die rekombinanten Proteine zeigten eine niedrigere katalytische Effizienz, die vermutlich auf die Störung durch die Kohlenhydratketten, an der Position 122 der Aminosäuresequenz, zurückzuführen ist.

Die Glykosylierung hat keinen Einfluss auf das pH-Verhalten von PhyC. Einen Shift des pH-Optimums wie Chan et al. für die Phytase von *Bacillus subtilis* 168 in *Nicotiana tabacum* beschrieben haben, konnte weder für PhyC aus *Nicotiana tabacum*, noch aus *Hordeum vulgare* festgestellt werden. Beide Enzyme haben wie das native Enzym ihr pH-Optimum zwischen 7,0 und 7,5 (Abbildung 50).

Auch bezüglich des isoelektrischen Punktes der rekombinanten PhyC-Proteine ergab sich keine Änderung (Abbildung 45), d.h. die Glykosylierung ist pH-neutral. Ähnliches wurde für eine *Aspergillus fumigatus* Phytase, die in *Aspergillus niger* und *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert wurde, ermittelt (Wyss, Pasamontes et al. 1999).

### 3.1.4 Eigenschaften der heterologen PhyK Proteine

Sajidan et al. isolierten die native PhyK aus *Klebsiella pneumoniae* ASR1 und produzierten gleichzeitig ein His-getagtes rekombinantes Protein in *E. coli*. Die native Phytase wies eine spezifische Aktivität von 224 U/mg auf. Für die rekombinante His-getagte Variante ermittelten sie eine um mehr als 50 % geringere spezifische Aktivität von 99 U/mg. Da die weiteren kinetischen Parameter nur für das rekombinante in seiner Aminosäuresequenz veränderte Protein angegeben wurden (Tabelle 16) sind die Vergleichsmöglichkeiten mit den in dieser Arbeit aus den Pflanzen gereinigten PhyK-Proteine eingeschränkt. Deshalb wurde zum Vergleich der Eigenschaften der rekombinanten PhyK-Proteine der Pflanzen die von T. Herter ermittelten Eigenschaften von PhyK aus *Arxula adeninivorans* herangezogen, der die rekombinante PhyK von Sajidan et al. mit der in *Arxula adeninivorans* exprimierte PhyK ohne His-Tag verglich. Der Vergleich ergab eine höhere spezifische Aktivität des Hefeproteins (481 U/mg) gegenüber dem *E. coli*-Protein (380 U/mg), eine gleich hohe Affinität zum Substrat Na-Phytat und eine höhere katalytische Effizienz (Herter 2009).

Die rekombinanten PhyK-Proteine der Pflanzen weisen eine Verringerung der spezifischen Aktivität, gegenüber der aus *Arxula adeninivorans* aufgereinigten PhyK, aus. Die spezifische Aktivität des aus Tabak aufgereinigten Proteins erreichte mit 116 U/mg um 76 % und die PhyK aus Gerste mit 254 U/mg um 48 % geringere Werte. Trotz der niedrigeren spezifischen Aktivität haben die rekombinanten PhyK-Proteine die gleiche Affinität (km-Wert um 0,047) zum Substrat Na-Phytat. Allerdings zeigen sie eine geringere katalytische Effizienz bei kleinerer Enzymwechselzahl (Tabelle 16). Dieses Ergebnis stimmt mit dem von T. Herter beschriebenen Effekt bei der Expression von PhyK mit His-Tag in *E. coli* überein (Herter 2009).

Die Änderungen bei der spezifischen Aktivität könnten sowohl auf eine mögliche Glykosylierung, als auch auf das Vorliegen einer nicht prozessierten Form, oder auf Verschmutzungen der gereinigten Proteine mit anderen Proteinen zurückzuführen sein. Das Letztere kann aufgrund des sehr hohen isoelektrischen Punktes um pH 9 nicht ausgeschlossen werden.

Da bei pH-Werten unter 9 die Oberflächenladung des Proteins stark positiv wird, ist die Trennung von anderen Proteinen erheblich erschwert, sodass, selbst mit Hilfe einer mit spezifischen Antikörpern beladenen Affinitätssäule, keine 100 %ige Reinigung erzielt werden kann. Der IP ist für alle in der Arbeit untersuchten Proteine mit ca. pH 9 bestimmt worden.

Untersuchungen im SDS-Gel weisen nach, dass neben der erwarteten Bande von 43 kDa sowohl bei PhyK aus *Nicotiana tabacum*, als auch bei PhyK aus *Hordeum vulgare* eine weitere Phytasebande mit einer Masse von ca. 46 kDa erscheint (Abbildung 41 und Abbildung 42). Die Massenzunahme könnte auf eine Glykosylierung der Proteine hindeuten. Die Berechnung potentieller Glykosylierungsstellen in der Aminosäuresequenz von PhyK hat ergeben, dass eine potentielle O-Glykosylierungsstelle an der Position T42 vorliegt.

Mit Hilfe der PAS-Färbung war eine Glykosylierung nicht nachweisbar (Abbildung 43). Dies könnte aber darauf zurückzuführen sein, dass die PAS-Färbung für die nur an einer Stelle erfolgte Glykosylierung nicht sensitiv genug ist. Ein Anhaltspunkt dafür ist, dass auch die rekombinante PhyC, die nachweislich an mindestens zwei Positionen glykosyliert vorliegt, nur eine sehr schwache Bande bei der PAS-Färbung zeigt.

Mit Tunicamycin läßt sich nur eine N-Glykosylierung des Proteins nachweisen. Diese kann aber nach Durchführung der transienten Expression von PhyK unter Tunicamycineinfluss ausgeschlossen werden, da sowohl mit, als auch ohne Tunicamycin, beide Expressionsbanden vorliegen (Abbildung 44). Das aber verschiedene Formen von PhyK vorliegen, verdeutlichen sowohl die transiente Expression (Abbildung 20), als auch die Aufreinigungen, die immer zwei Banden zeigen (Abbildung 41 und Abbildung 42). Die Aufreinigung von PhyK aus *Arxula adenivorans* läßt nur eine Form erkennen. T. Herter hat aber auch für diese zwei Banden beschrieben und führt dies auf das Vorliegen einer unprozessierten Form der Phytase zurück (Herter 2009).

Die in dieser Arbeit untersuchten Eigenschaften der rekombinanten Proteine, wie pH-Optimum (Abbildung 51), Temperaturoptimum (Abbildung 48) und Thermostabilität (Abbildung 49) weisen gegenüber der nativen von Sajidan et al. untersuchten PhyK keine Veränderungen auf.

### 3.2 Veränderung des Phytatgehalts der Samen

Die Versorgung mit Phosphor ist lebensnotwendig für die menschliche Gesundheit und die optimale Entwicklung von Tieren. Obwohl Getreide und Leguminosensamen genügend Phosphor enthalten, können monogastrische Tiere diesen nicht nutzen, da er in Form von Phytinsäure vorliegt. Um ihn für Mensch und Tier besser verfügbar zu machen sind verschiedene Strategien entwickelt worden:

1. Züchtung von Getreiden und Leguminosen, die Samen mit einem niedrigen Phytinsäuregehalt enthalten (*lpa*-Mutanten)
2. gentechnische Veränderung der Futterpflanzen durch Einführung von heterologen Phytasegenen
3. Behandlung der Futtermittel mit pilzlichen Phytasen

In den frühen 1990er Jahren begann die Suche nach sogenannten „low-phytic acid“-Mutanten (*lpa*). Sie wurden in Mais, Gerste, Reis, Weizen, Sojabohnen und *Arabidopsis thaliana* gefunden und charakterisiert (Larson, Young et al. 1998; Rasmussen and Hatzack 1998; Lott, Ockenden et al. 2000; Raboy, Gerbasi et al. 2000; Dorsch, Cook et al. 2003).

Der erste Bericht über Mutationen im Mais, die die Akkumulation von Phytinsäure in den Samen stören, stammt von Raboy et al. (Raboy and Gerbasi 1996). Für *Hordeum vulgare* charakterisierten Larson et al. zwei Mutationstypen, die den Gehalt an Phytinsäure in den Samen reduzieren (Larson, Young et al. 1998)

Raboy et al. fanden heraus, dass für Mais und Gerste *lpa*-Mutanten in zwei Phenotypen unterscheidbar sind. Samen mit dem *lpa1*-Phenotyp weisen eine Reduktion ihres Phytinsäuregehalts von 50-75 % bei unverändertem Gehalt an niedrigeren Inositolphosphaten auf. Auch der *lpa2*-Phenotyp zeigt eine Phytinsäurereduktion um 50-75 %, hat aber zusätzlich noch einen Anteil an niedrigeren Inositolphosphaten von 8-15 % am Gesamtphosphor. Für den *lpa1*-Mutationstyp stellten Raboy et al. weiterhin fest, dass die Verringerung an Phytinsäure mit einem äquimolaren Anstieg an anorganischem Phosphor (Pi) einhergeht. Der *lpa2*-Typ ist durch einen Anstieg an Pi oder niedrigeren Inositolphosphaten mit 5 oder weniger Phosphatresten gekennzeichnet (Raboy, Gerbasi et al. 2000).

In dieser Arbeit wurde versucht, den Phytinsäureanteil am Gesamtphosphor der Samen mittels Einführung rekombinanter Phytasen zu senken, um so den Phosphor für Menschen und Tiere besser verfügbar zu machen. Dies sollte durch die Expression von PhyC und

PhyK in den Samen geschehen. Signalpeptide sollten für den Transport der Proteine an den Speicherort des Phytats sorgen. Die Koexistenz von Phytinsäure und Phytasen soll für die Reduktion der Phytinsäure und eine Erhöhung des Gehalts an frei verfügbarem Phosphor bedingen.

Für die Wirkung eines heterologen Proteins ist seine Lokalisation innerhalb des Wirtsorganismus von größter Bedeutung. Die Synthese der Phytinsäure, bzw. die kritischen Schritte finden im Zytoplasma statt (Raboy 2007). Der genaue Hergang des Transports der Phytinsäure ist noch nicht abschließend geklärt. Nach dem Transport findet sich das Substrat der Phytasen in den Proteinspeichervakuolen im Aleuron und im Embryo des Samens wieder (Raboy 2007). Die Zusammensetzung des Aleurons von *Hordeum vulgare* L. Samen untersuchten Jacobsen et al. mit Hilfe von verschiedenen Färbetechniken sowie Licht- und Elektronenmikroskopie (Jacobsen, Knox et al. 1971). Sie stellten fest, dass dieses Gewebe Proteine, Phytin, Phospholipide, RNA und einige Kohlenhydrate enthält. Sie wiesen nach, dass sich das Phytin und anorganisches Phosphat zusammen mit Lipiden und auch Proteinen in den sogenannten Globoid-Kristallen befinden. Für die Speichervakuolen zeigten sie, dass diese die höchste Konzentration an Proteinen und die Kohlenhydrate beinhalten. Die Anhäufung der Phytinsäure erfolgt zusammen mit Calcium- und Magnesiumionen als Phytin (Lott 1984). Dabei ist die Einlagerung von Phytin auf Zellen beschränkt, die während der Samenruhe am Leben bleiben.

Soll der Gehalt an Phytin in den Samen reduziert werden, müssen die rekombinanten Phytasen, entweder am Syntheseort, auf dem Transportweg oder am Einlagerungsort wirken. Arcalis et al. stellten für eine in Weizen exprimierte, mit einem anderen apoplastischen Signalpeptid versehene, *Aspergillus niger* Phytase fest, dass diese unabhängig von dem apoplastischen Signalpeptid in die Proteinspeichervakuole transportiert wurde (Arcalis, Marcel et al. 2004). Brinch-Pedersen et al. machten die Lokalisation, der mit dem  $\alpha$ -Amylasesignalpeptid versehenen *Aspergillus fumigatus* Phytase in den Samen, mit Hilfe von Immunogoldlabeling und Elektronenmikroskopie sichtbar. Auch sie detektierten die Phytase, trotz des apoplastischen Signalpeptids, in den Protein-Speichervakuolen (Brinch-Pedersen, Hatzack et al. 2006).

Die in dieser Arbeit verwendeten apoplastischen Signalpeptide (OxOA und PSP) sollen für das Targeting der rekombinanten Proteine in den Samen, analog des von Arcalis et al. und Brinch-Pedersen et al. beschriebenen Effekts, in die Proteinspeichervakuole sorgen, da Coello et al. für die *E. coli* Phytase *appA* zeigten, dass diese, mit einem Signalpeptid zum

Transport in die Proteinspeichervakuolen verbunden, zu einer Reduktion des Phytinsäuregehalts mit gleichzeitigem Anstieg des anorganischen Phosphors führte.

Außer den beiden apoplastischen Signalpeptiden, wurde in dieser Arbeit die Signalsequenz der samenspezifischen Chitinase 26 (Chi26) aus *Hordeum vulgare* L. verwendet. Leah et al. zeigten für die Chitinase, dass sie während der späten Phase der Samenentwicklung gewebespezifisch im Aleuron in großen Mengen (80 µg/g Samen) akkumuliert. Im stärkehaltigen Endosperm konnten sie dagegen nur geringe Mengen des Proteins identifizieren (Leah, Tommerup et al. 1991).

Die Lokalisation der rekombinanten Phytaseproteine innerhalb der Samen wurde in dieser Arbeit nicht analysiert. Da aber die Signalpeptide OxOA und PSP normalerweise ein apoplastisches Targeting bedingen, wurde davon ausgegangen, dass sich die Proteine ähnlich, wie von Arcalis et al. und Brinch Pedersen et al. beschrieben, verhalten. Das Signalpeptid der Chitinase 26 sollte ebenfalls für den Transport des rekombinanten PhyC-Proteins in das Aleuron sorgen.

Es wurde nachgewiesen, dass alle rekombinanten Proteine (PhyC, PhyK) in den Samen akkumulieren (Abbildung 29 C und Abbildung 30 C). Dabei zeigten sich, bei Auftragung gleicher Gesamtproteinmengen im Westernblot, Varianzen bezüglich der Intensität der spezifischen Phytasebanden. So wiesen die Linien mit *phyC<sub>cop</sub>*PSP eine intensivere Bande, als die der anderen Konstrukte mit *PhyC<sub>cop</sub>* auf. Dies deutet darauf hin, dass das Genprodukt von *phyC<sub>cop</sub>*PSP in höherer Konzentration vorlag. Die Linie *phyC<sub>cop</sub>*Chi26 1, die gegenüber der Linie 8 desselben Konstruktes ein höheres Expressionslevel der Phytase in den Blättern besaß, zeigte auch in den Samen eine intensivere Bande. Dass eine Korrelation zwischen der Intensität der Phytasebanden im Westernblot (Abbildung 29 C) und der Menge an PhyC in den Samen besteht, beweisen auch die bei pH 7 und 65 °C gemessenen Phytaseaktivitäten (Tabelle 5). Die Linien mit *phyC<sub>cop</sub>*PSP besaßen am Temperatur- und pH-Optimum von PhyC mit 2,63 U/g Samenmehl eine 32fach höhere Aktivität als der Wildtyp mit 0,081 U/g Samenmehl. Die Linie 1 von *phyC<sub>cop</sub>*Chi26 hatte eine 22fach höhere Aktivität als der Wildtyp. Die im Westernblot nur sehr schwach repräsentierte Linie 8 des Konstrukts *phyC<sub>cop</sub>*Chi26 zeigte dagegen nur eine 5fach höhere Aktivität. Die Linien des Konstrukts *phyC<sub>cop</sub>*OxOA wiesen im Mittel eine 20fach höhere Aktivität aus und lagen damit deutlich höher als die im Wildtyp gemessenen.

Weiterhin war ein Unterschied in der Molekülgröße zwischen den rekombinanten PhyC-Proteinen feststellbar, der auf Varianten in der Glykosylierung zurückzuführen ist. Die Linien mit *phyC<sub>cop</sub>*PSP hatten die gleiche Masse wie die native PhyC. Das bedeutet, dass eine Glykosylierung unwahrscheinlich ist. Im Vergleich dazu wiesen die rekombinanten Phytasen der beiden Konstrukte *phyC<sub>cop</sub>*OxOA und *phyC<sub>cop</sub>*Chi26 eine höhere Molmasse auf und lagen deshalb mit großer Wahrscheinlichkeit glykosyliert vor.

Das PhyK-Protein stellte sich im Westernblot als eine ähnlich intensive Bande dar wie das Genprodukt von *phyC<sub>cop</sub>*PSP (Abbildung 30 C). Seine Molmasse zeigte gegenüber dem Vergleichsprotein PhyK aus *Arxula adeninivorans* keine Veränderung. Die Phytaseaktivität betrug bei pH 5 und 50 °C 8,46 U/ g Samenkornmehl (Tabelle 6). Damit war die Aktivität beim Temperatur- und pH-Optimum von PhyK gegenüber der des Wildtyps um das 24fache erhöht. Die Aktivitäten der rekombinanten *Klebsiella* Phytase waren in ihrer Höhe mit denen von Brinch-Pedersen et al. für die saure *Aspergillus fumigatus* Phytase in Weizensamen gemessenen (4,8 U/ g Samenkornmehl bei 37 °C) durchaus vergleichbar (Brinch-Pedersen, Hatzack et al. 2006), da die *Aspergillus* Phytase bei 37 °C nur ca. 70 % ihrer Aktivität im Vergleich zu 50 °C aufweist (Ullah, Sethumadhavan et al. 2000).

### 3.2.1 Anteil von Phytinsäure und anorganischem Phosphor am Gesamtphosphor der Samen

Bisherige Untersuchungen, von verschiedenen *Hordeum vulgare* L. Sorten, zeigten eine natürliche Schwankungsbreite von 60-75 % beim Phytatgehalt der Samen, bezogen auf ihren Gesamtphosphorgehalt, in Abhängigkeit von Sorte und Kultivierungsbedingungen (Lolas, Palamidis et al. 1976; Larson, Young et al. 1998; Liu, Peterson et al. 2007). Den Gehalt an anorganischem Phosphor bestimmten Larson et al. mit einem Anteil von 5-10 % am Gesamtphosphor der Samen.

In dieser Arbeit wurde der Phytinsäureanteil, der Anteil an anorganischem Phosphor und der Gesamtphosphorgehalt der Samen von *Hordeum vulgare* L. cv. Golden Promise und seinen transgenen Linien analysiert.

Der Anteil der Phytinsäure am Gesamtphosphor betrug für den Wildtyp 55 %, für die transgenen Linien von PhyC zwischen 55-65 % und für die Linien mit PhyK 48 % (Abbildung 34). Der Anteil an anorganischem Phosphor am Gesamtphosphor war für den Wildtyp 4,4 % und lag für die transgenen Linien zwischen 6,0 % und 9,4 %.

Für die transgenen Linien *phyC<sub>cop</sub>PSP* ergab sich für die Phytinsäure keine signifikante Abweichung vom Wildtyp, aber der Anteil an anorganischen Phosphor war signifikant auf 6,65 % erhöht. Der Phytinsäuregehalt der transgenen Linien *phyC<sub>cop</sub>OxOA* unterschied sich mit 60,2 % von dem des Wildtyps, bei gleichzeitigem Anstieg des anorganischen Phosphors auf 6,31 %. Auch die Linie *phyC<sub>cop</sub>Chi26 1* wiesen eine Erhöhung des Phytinsäureanteils auf 65,1 % aus, bei gleichzeitigem Anstieg des Pi-Wertes auf 7,34 %. Die Linie *phyC<sub>cop</sub>Chi26 8* mit der niedrigen Phytaseaktivität hatte mit 55,1 % keinen höheren Phytinsäuregehalt als der Wildtyp, zeigte aber ebenfalls eine Erhöhung des Gehalts an anorganischem Phosphor auf 6,07 %.

Die Ursache für den Anstieg des Anteils an Phytinsäure könnte eine Veränderung der Zusammensetzung der Samen sein. Einen ähnlichen Anstieg des Phytinsäuregehalts beobachteten Brinch-Pedersen et al. bei der Expression einer *Aspergillus fumigatus* Phytase in Weizen (*Triticum aestivum* L.) (Brinch-Pedersen, Hatzack et al. 2006). Sie schrieben diesen Effekt dem Umstand zu, dass die Samen der transgenen Linien kleiner ausfallen und damit der relative Anteil des Phosphor-enthaltenden Aleurongewebes und des Embryos am Samenkorn größer wird. Der Anteil an anorganischem Phosphor wurde von ihnen nicht bestimmt.

Die Anteile des embryonalen Gewebes, des Aleurons und des Endosperms der Linien *phyC<sub>cop</sub>OxOA* und *phyC<sub>cop</sub>Chi26 1*, wurden nicht näher untersucht. Der Anstieg des IP6-Gehalts (Tabelle 7) und der des anorganischen Phosphors könnten aber, wie von Brinch-Pedersen gezeigt, für die veränderten Massenanteile der Gewebe in den Samen verantwortlich sein. Dagegen spricht aber, dass sich für die in dieser Arbeit analysierten Pflanzen des Wildtyps ein für die Sorte Golden Promise normales Gewicht von 38 mg/Samen ergab (Pickering, Niks et al. 2004) und kein signifikanter Unterschied zu den transgenen Linien mit *PhyC* auftrat.

Warum die Linie von *phyC<sub>cop</sub>Chi26 8* mit dem niedrigeren Phytaselevel keine Erhöhung der Phytinsäure, aber einen Anstieg des anorganischen Phosphors (Tabelle 7) im Vergleich zum Wildtyp zeigte, lässt sich nicht mit den Untersuchungen von Brinch-Petersen et al. und Hatzack et al. erklären. Des weiteren lassen die Chromatogramme der HPIC-Läufe von *phyC<sub>cop</sub>OxOA* und *phyC<sub>cop</sub>Chi26* neben dem Phytinsäurepeak einen Peak von *Ins(1,2,4,5,6)P5* erkennen, die der Wildtyp in dieser Intensität nicht aufweist (Abbildung 35). Dies deutet eventuell doch auf eine Einwirkung von *PhyC* auf die Phytinsäure hin, zumal der pH-Wert in den Proteinspeichervakuolen deutlich höher ist, als im Zytoplasma



(He, Huang et al. 2007). Die Erhöhung des Pi-Gehalts spricht gleichfalls dafür. Ferner besitzen auch die Linien mit *phyC*<sub>cop</sub>PSP einen höheren anorganischen Phosphorgehalt bei unverändertem Gehalt an Phytinsäure.

Da hier das rekombinante Protein aber unglykosyliert vorzuliegen scheint, könnte es innerhalb des Samens anders lokalisiert sein, als das PhyC der anderen Linien. Wenn keine Glykosylierung vorliegt, bedeutet dies, dass das Targeting von PhyC vermutlich nicht über das Endoplasmatische Retikulum oder den Golgi-Apparat verläuft. Es könnte zum Beispiel im Zytoplasma lokalisiert sein.

Da im Zytoplasma pH-Bedingungen um pH 5-5,5 vorherrschen, würde dies eine nur sehr geringe Phytaseaktivität zur Folge haben und wahrscheinlich keinen wesentlichen Einfluss auf den Phytinsäuregehalt bewirken. Der Anstieg des anorganischen Phosphors resultiert vermutlich aus der Restaktivität von ca. 5-10 %. Für den endgültigen Beweis, dass sich die Phytase im Zytoplasma befindet, müsste die genauere Lokalisation im Samen analysiert werden.

Im Gegensatz zu den Linien mit PhyC ließ sich für die Linien mit PhyK eine signifikante Reduktion des Phytinsäureanteils am Gesamtphosphor auf 48,2 % ( $P < 0,01$ ) beobachten, obwohl das Trockengewicht der Samen mit 35 mg/Samen im Durchschnitt etwas niedriger lag, als das des Wildtyps. Die Reduktion der Phytinsäurekonzentration konnte auch optisch durch Übereinanderlegen der HPIC-Chromatogramme sichtbar gemacht werden (Abbildung 36). Weiterhin ließ sich ein Anstieg des Anteils von anorganischem Phosphor am Gesamtphosphor auf 9,4 % feststellen (Tabelle 7).

Mit großer Wahrscheinlichkeit ist die Änderung des IP6-Gehaltes und die des anorganischen Phosphors auf die Aktivität von PhyK während der Samenentwicklung zurückzuführen, da das Protein in den Samen nachgewiesen werden konnte (Abbildung 30).

Anders als bei Coello et al., die das *Escherichia coli* Phytasegen *appA* in *Arabidopsis thaliana* mit einem Signalpeptid für ein Targeting des Genprodukts in die Proteinspeichervakuole exprimierten (Coello, Maughan et al. 2001), könnte PhyK mit dem Signalpeptid PSP welches ein anderes Targeting aufzuweisen scheint, mit ihrer Aktivität im Zytoplasma den Phytinsäuregehalt gesenkt haben. Hierfür müsste die genaue Lokalisation des Proteins untersucht werden. Gegen die zytoplasmatische Lokalisation von PhyK sprechen allerdings die Ergebnisse von Bilyeu et al., die *appA* aus *E. coli* ohne Signalpeptid in Sojabohnen

exprimierten und neben der zytoplasmatischen Lokalisation der Phytase, die vollständige Reduktion des Phytinsäureanteils in den Samen, bei gleichzeitigem Anstieg des anorganischen Phosphors nachwiesen (Bilyeu, Zeng et al. 2008).

Da in der Literatur der Phytinsäuregehalt von Samen nicht nur als Anteil am Gesamtphosphor, sondern auch als Anteil am Trockengewicht angegeben wurde, sind die Ergebnisse für eine bessere Vergleichbarkeit, auch in dieser Form dargestellt (Tabelle 7).

Die Analysen von Hatzack et al. haben für *Hordeum vulgare* L. cv. Pallas einen Phytinsäureanteil von 1,67 % am Trockengewicht ergeben (Hatzack, Johansen et al. 2000). Dorsch et al. bestimmten für *Hordeum vulgare* L. cv. Harrington umgerechnet einen Anteil von Phytinsäure am Trockengewicht von 1,025 % und für den anorganischen Phosphor von 0,04 % (Dorsch, Cook et al. 2003).

In dieser Arbeit wurden für den Wildtyp cv. Golden Promise 1,45 % Phytinsäure und 0,033 % Pi gemessen. Die Linien von *phyC<sub>cop</sub>OxOA* wiesen dazu eine signifikante Erhöhung um 3,1 % an Phytinsäure und 27,3 % an Pi auf. Die Linie mit *phyC<sub>cop</sub>Chi26 1* zeigte einen Anstieg an Phytinsäure um 6,2 % und an Pi um 48,5 %.

Eine Reduktion des Phytinsäuregehalts um 19,3 % ließ sich nur für die Linien mit PhyK feststellen. Sie wiesen eine Erhöhung des Pi-Gehalts um 78,8 % auf. Dies entspricht nahezu einer Verdopplung des Gehaltes an frei verfügbarem Phosphor und stimmt in der Aussage mit den Ergebnissen von Chiera et al. überein. Diese analysierten den Phytinsäuregehalt von Sojabohnen (*Glycine max*), die Sojabohnenphytase exprimierten. Sie stellten eine Reduktion des Phytinsäuregehalts zwischen 12,6 % und 24,8 % bei einer nahezu Verdreifachung des Pi-Gehaltes fest (Chiera, Finer et al. 2004). Die genaue Lokalisation der Phytase untersuchten sie nicht.

Die Gesamtphosphorgehalte der im Gewächshaus gezogenen Samen von *Hordeum vulgare* L. cv. Golden Promise wurden in dieser Arbeit bestimmt (Tabelle 7 und Tabelle 8). Alle gemessenen Werte für diese Sorte sind fast doppelt so hoch wie für andere in der Literatur angegebene Sorten. Um einen methodischen Fehler auszuschließen wurden sowohl der Gesamtphosphorgehalt, das *InsP6* und der anorganische Phosphor einer weiteren Sorte (cv. Pasadena) ermittelt. Die Samen der Sorte Pasadena stammte aus Freilandsaatgut. Die für die Sorte Pasadena nachgewiesenen Gehalte entsprechen denen in der Literatur angegebenen (Hatzack, Johansen et al. 2000; Dorsch, Cook et al. 2003). Da keine Unterschiede in der

der Handhabung des Probenmaterials bestanden haben, wurde ein methodischer Fehler ausgeschlossen und für die Veränderung die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen verantwortlich gemacht.

### 3.3 Wachstumsversuche

Ein großer Teil des organischen Phosphors im Boden liegt in Form von Phytinsäure gebunden vor. Die Fähigkeit diese Phosphorressourcen zu nutzen ist zwischen den einzelnen Pflanzenarten unterschiedlich ausgeprägt und differiert selbst innerhalb der Art. Bei Untersuchungen von verschiedenen Weizensorten bezüglich ihrer Fähigkeit Phytat aus dem Boden als Phosphorressource zu mobilisieren, kamen Osborne und Rengel zu der Erkenntnis, dass für die einzelnen Sorten die Nutzbarkeit im Vergleich mit anorganischem Phosphor (100 %) zwischen 18 und 30 % schwankte (Osborne and Rengel 2002).

In der Landwirtschaft wäre es wichtig, eine stabile, sortenunabhängige Nutzung der Phosphorreserven aus Phytat zu erreichen. Es existieren verschiedene Möglichkeiten dies zu bewirken.

Zum Beispiel der gemeinsame Anbau von phytatnutzenden Arten mit Arten die diese Fähigkeit nicht besitzen. So konnten Li et al. nachweisen, dass die Cokultivierung von *Cicer arietum* L cv. Sona mit *Zea mays* L. cv. Zhongdan Nr.2, mit Phytat als einziger P-Quelle, die Biomasseproduktion des Mais verbessert (Li, Li et al. 2004).

Eine weitere Strategie ist die Cokultivierung der Pflanzen mit Mikroorganismen, die die Phytinsäure spalten und für die Pflanze verfügbar machen. Idriss et al. belegten in ihren Untersuchungen, dass die Cokultivierung von *Zea mays* L. cv Elita und *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45, mit Phytat als P-Quelle, zur Verbesserung des Wachstums führt (Idriss, Makarewicz et al. 2002).

Ein weiteres, auch in dieser Arbeit genutztes Mittel, den Phosphor für die Pflanzen besser verfügbar zu machen, ist die Erzeugung transgener Pflanzen, die bakterielle, pflanzliche oder pilzliche Phytasen über die Wurzel sekretieren. Lung et al. führten Wachstumsversuche mit transgenen *Nicotiana tabacum* Pflanzen durch, die eine *Bacillus subtilis* Phytase sekretierten. Sie wählten sterile Versuchsbedingungen mit phytathaltigem MS-Medium aus und konnten eine Steigerung der Sprossbiomasse gegenüber dem Wildtyp um das 1,7-2,2fache erreichen (Lung 2005).

### 3.3.1 Wachstumsversuche mit *Nicotiana tabacum* pMA-P1 und pMA-R1

Die Wachstumsversuche wurden mit den transgenen *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun Linien pMA-P1 und pMA-R1 durchgeführt, die Phytasen mit unterschiedlichen pH-Spektren exprimierten, sodass sowohl für saure, als auch für alkalische Böden eine Aussage über einen eventuellen Wachstumsvorteil der transgenen Pflanze gegenüber dem Wildtyp getroffen werden konnte. Die Wurzelexudate, die unter sterilen Bedingungen über 240 h gesammelt wurden, zeigten eindeutig, dass die transgenen Pflanzen die Phytase sekretierten und dass das Protein in der Nährlösung akkumulierte (Abbildung 28). Der Nachweis wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper erbracht.

Die mit verschiedenen Phosphorquellen auf Quarzsand durchgeführten Wachstumsversuche fanden, um die pflanzeigene Phosphormangelantwort zu aktivieren, und um die gebildeten Biomassen mit denen der rekombinante Phytase sekretierenden Transgenen vergleichen zu können, unter Phosphormangelbedingungen statt. Um den natürlichen Wachstumsbedingungen näher zu kommen, wurden die Wachstumsversuche unter unsterilen Bedingungen durchgeführt. Entsprechend dem pH-Optimum der jeweiligen rekombinanten Phytase, wurden die Versuche im sauren und im neutralen Bereich vorgenommen und so das Vorhandensein verschiedener pH-Bereiche der Böden grob simuliert. Als P-Quelle wurde Na-Phytat und zum Vergleich  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , als Variante mit frei verfügbarem anorganischen Phosphor genutzt. Die Konzentration an  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  wurde, entsprechend der von der jeweiligen Phytase beschrittenen Abbaustufe, angepasst. Für die Linien mit PhyC wurde die dreifache Menge an Pi aus  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  verwendet, da diese Phytase in der Lage ist, das Phytat bis zum *Ins*(2,4,6)P3 zu spalten. Für PhyK wurde die fünffache Menge an Pi eingesetzt, da diese Phytase das Phytat bis zu *Ins*(2)P abbaut.

Die Wachstumsversuche mit *Nicotiana tabacum* haben ergeben, dass für die Linien mit PhyC ein signifikanter Wachstumsvorteil von bis zu 34 % auf Phytat unter P-Mangelbedingungen, im Gegensatz zum Wildtyp besteht. Allerdings ist auch der Wildtyp in der Lage einen Teil der Phosphatressourcen aus Phytat zu mobilisieren, denn im Vergleich mit den auf anorganischem Phosphat (100 %) gewachsenen Wildtyppflanzen, wies der Wildtyp immer noch 27 % der Sprossbiomasseproduktion auf Phytat auf. Die transgenen Pflanzen zeigten einen Zuwachs der Biomasseproduktion von bis zu 43 % gegenüber den auf anorganischem Phosphat gewachsenen Transgenen. Dass der Wildtyp in der Lage ist das Phytat zu nutzen, ist darauf zurückzuführen, dass *Nicotiana tabacum* eine eigene Phytase in das Medium sekretiert und der Pflanze ermöglicht einen Teil des dort gebunde-

nen Phosphors für sich zu verwenden. (Lung and Lim 2005). Trotz dieser Tatsache zeigten die Ergebnisse deutlich, dass ein Wachstumsvorteil für die transgenen *Nicotiana tabacum* Pflanzen unter neutralen pH-Bedingungen bestand. Der Wachstumsvorteil der Transgenen mit PhyC fällt allerdings gegenüber dem Wildtyp unter unsterilen Bedingungen geringer aus, als Lung et al. für sterile Wachstumsbedingungen berichteten (Lung 2005).

Ähnliche Ergebnisse präsentierten George et al. (George, Simpson et al. 2005). Sie exprimierten eine *Aspergillus niger* Phytase in *Nicotiana tabacum* L. cv. W38 und dokumentierten, dass die transgenen Pflanzen auf phytathaltigem Boden unter unsterilen Bedingungen eine um 24 % höhere Sprossbiomasse auf phytathaltigem Boden hatten, als die Kontrollpflanzen.

Eine Erklärung dafür, dass der Wachstumsvorteil unter unsterilen Bedingungen kleiner ausfällt, könnte die Anwesenheit von phytasesekretierenden Mikroorganismen während der Kultivierung der Pflanzen sein, welche dafür sorgt, dass auch dem Wildtyp ein Teil des Phosphors aus dem Phytat zur Verfügung stellt.

Eine weitere Option wäre, dass der neutrale pH-Wert der Bodenlösung durch die Sekretion von organischen Säuren, als Antwort auf den Phosphormangel im Bereich der Wurzel, zu einer Absenkung des pH-Wertes führt und so den möglichen positiven Effekt der heterologen Phytase PhyC teilweise wieder kompensiert.

Im Gegensatz zu den PhyC exprimierenden *Nicotiana tabacum* Pflanzen, zeigten die PhyK sekretierenden Pflanzen keinen signifikanten Wachstumsvorteil gegenüber unter denselben Bedingungen gezogenen Wildtyppflanzen. Dies hängt vermutlich mit den pflanzeigenen Abbaumöglichkeiten phosphorhaltiger Verbindungen unter sauren Bedingungen zusammen. Möglicherweise ist die Aktivität der pflanzeigenen Phytase im sauren pH-Bereich größer, als unter den neutralen Bedingungen. Ein Hinweis darauf ist die um 54 % höhere Sprossbiomasse von Pflanzen des Wildtyps, die bei pH 5 auf Phytat wuchsen, gegenüber denen die unter neutralen pH-Bedingungen kultiviert wurden. Des Weiteren sind andere, bei neutralen bis alkalischen Bedingungen schwer zugängliche Mineralstoffe, die die Pflanzen benötigen, wie z.B. Eisen oder Calcium, besser resorbierbar.

### 3.3.2 Wachstumsversuche mit *Hordeum vulgare* *phyC*<sub>cop</sub>PSP, *phyC*<sub>cop</sub>OxOA und *phyK*PSP

Während der Einsatz von *Hordeum vulgare* Varietäten als Futtergerste nur von begrenzter ökonomischer Bedeutung ist, sind Ertragssteigerungen der Braugerste für die Bierherstellung von besonderem wirtschaftlichem Interesse.

Bei Wachstumsversuchen mit transgenen Linien von *Hordeum vulgare* L. cv. Golden Promise wurden weder für die Linien mit *PhyC*, noch für die Linien mit *PhyK* signifikante Wachstumsvorteile bei Wachstum mit Phytat als einziger P-Quelle festgestellt, obwohl die Sekretion der Phytasen mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen wurden. Jedoch schienen die *PhyC*-Proteine im Gegensatz zu *PhyK* nicht stabil zu sein.

Aus den Ergebnissen lässt sich weiterhin ableiten, dass der Wildtyp bei pH 7 eine Sprossbiomasse von fast 57 % gegenüber dem Wachstum mit anorganischem Phosphor (100 %) erreicht, bei pH 5 sind es sogar 67 %. Die transgenen Linien zeigen eine ähnliche Tendenz. Die Sprossbiomasse von *PhyC* auf Phytat beträgt 56 % der Biomasse, der auf anorganischem Phosphor gewachsenen Transgenen. Für *PhyK* sind es 59,5 %.

Die offensichtliche Nutzung des Phytats durch die Gerste könnte dadurch erklärt werden, dass die Wildtyppflanzen in der Lage sind eigene Phytasen zu sekretieren. Farouq Asmar berichtete über extrazelluläre Phytaseaktivitäten von Gerstenwurzeln unter sauren Bedingungen. Er wies nach, dass diese Aktivitäten sowohl Wurzel-assoziiert vorlagen, als auch von den Wurzeln sekretiert wurden. Desweiteren konnte er zeigen, dass die Höhe der Phytaseaktivitäten zwischen den einzelnen Sorten schwankte (Asmar 1997).

Allerdings zeigten sowohl die Pflanzen mit *PhyC*, als auch die mit *PhyK* im Spross um fast die Hälfte reduzierte Phosphorgehalte, gemessen an den auf anorganischem Phosphor gewachsenen Pflanzen. Die ermittelten Phosphorgehalte auf Phytat gezogener Pflanzen sind darüber hinaus mit denen vergleichbar, die ganz ohne zusätzliche P-Quelle auskommen mussten. Die niedrigen Phosphorgehalte (Tabelle 21 und Tabelle 22) weisen auf eine schlechte Versorgung mit Phosphor hin und lassen vermuten, dass die Pflanzen auf Phytat ein erhöhtes Wachstum pro aufgenommene Phosphormenge aufweisen. Dies ist ihnen z.B. durch das Beschreiten alternativer respiratorischer Wege, Veränderungen im Kohlenstoffwechsel und Remobilisierung interner Phosphorressourcen möglich. (Schachtman, Reid et

al. 1998; Plaxton and Carswell 1999; Raghothama 1999; Uhde-Stone, Gilbert et al. 2003; Uhde-Stone, Zinn et al. 2003).

Wenn auch der Einsatz transgener Gerste mit exprimierter bakterieller Phytase unter unseren experimentellen Bedingungen zu keinem verbesserten Wachstum unter Phosphatmangelbedingungen geführt hat, so kann es zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass die Einführung rekombinanter bakterieller Phytasen in andere Kulturpflanzen nicht zu einem verbesserten Wachstum dieser transgenen Pflanzen führen könnte. Besonders aussichtsreich erscheint dabei die Transformation solcher Pflanzen, die über keine eigene bzw. nur sehr geringe sekretorische Phytaseaktivität verfügen, wie z.B. *Oryza sativa* L. oder *Lupinus albus* L. (Li, Osaki et al. 1997). Der bei transgenen *Nicotiana tabacum* Pflanzen erzielte Wachstums-Effekt ist als ein ermutigender Beginn für solche weiterführende Untersuchungen anzusehen.





## 4 Material

### 4.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme wurden in Tabelle 23 aufgelistet.

**Tabelle 23** Bakterienstämme

STAMM	GENETISCHE MARKER	REFERENZ
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105	Km(S) Derivat von EHA101 (Genotyp: C58 pTiBo542)	(Hood, Gelvin et al. 1993)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL1	AGL0 <i>recA::bla</i> pTi-Bo542ΔT Mop+C <sub>br</sub>	(Lazo, Stein et al. 1991)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV2260	C58C1 [pGV2260] (Genotyp: C58C1 pTiB6s3ΔT C <sub>br</sub> )	(Deblaere, Bytebier et al. 1985)
<i>Arxula adeninivorans</i> LS3 G1211	<i>aleu2</i>	(Wartmann, Stoltenburg et al. 2003)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB45	Wildtyp	(Krebs, Hoding et al. 1998)
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , Δ <i>lacU169</i> (Ø80 <i>lacZ</i> ΔM15), <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>endA1</i>	(Hanahan 1983)
<i>Klebsiella sp.</i> ASR1	Wildtyp	(Sajidan, Farouk et al. 2004)

### 4.2 Pflanzenmaterial

Die für die genetische Manipulation verwendeten Pflanzen sind in Tabelle 24 aufgeführt.

**Tabelle 24: Pflanzenarten**

ART	SORTE
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	Samsun NN
<i>Hordeum vulgare</i> L. subsp. <i>vulgare</i>	Golden promise (Sommergerste)

### 4.3 Plasmide

#### 4.3.1 Plasmide für die Konstruktion der Expressionskassette für *Nicotiana tabacum*

##### 4.3.1.1 pUC18

Der Klonierungsvektor pUC18 (GenBank/EMBL accession number L09136) wurde für die Zwischenklonierung der PCR-Produkte eingesetzt.

##### 4.3.1.2 pMA

**Tabelle 25:** Plasmid pMA

TYP	START	ENDE	NAME	BESCHREIBUNG	ACCESSIONNUMBER
Region	1	618	oriV	vegetativer Origin	M20134
Gen	693	964	kilA	Tellurit Resistenzgen	M62846
Region	1316	2085	IS1	transposables Element	X58999
Gen	2086	3078	NPTIII	Kanamycin Resistensgen	V01547
Gen	3079	4560	trfA	Replikationsprotein	X00713
Region	6043	6190	LB	Left T-DNA Border	J01825
Region	6773	7316	CaMV 35S	Promotor	CS539257
Region	7311	7356	mcs	Multicloning site	

Das Plasmid pMA diene als binärer Vektor für die Transformation der Expressionskassetten in *Nicotiana tabacum*.

### 4.3.2 Plasmide für die Konstruktion der Expressionskassette für *Hordeum vulgare*

#### 4.3.2.1 UBIP-ABM

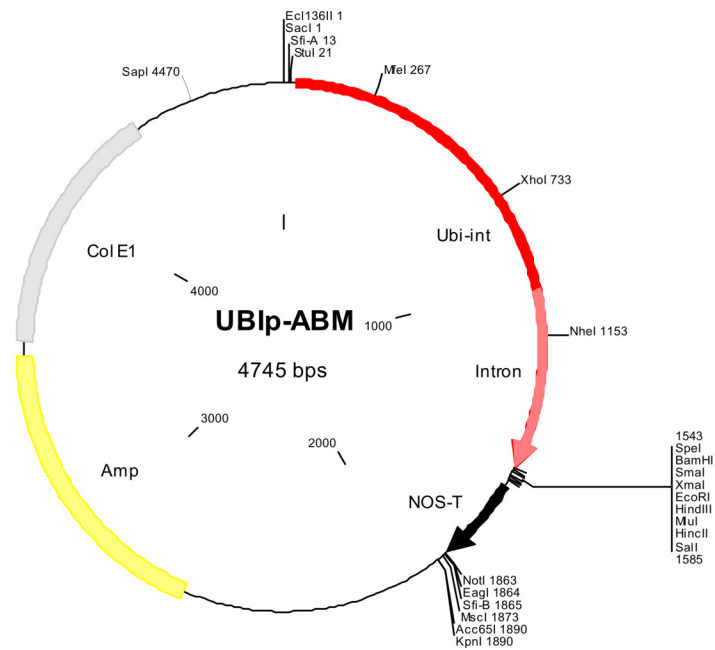


Abbildung 53: Plasmid UBIP-ABM

Tabelle 26 Plasmid pUBI-ABM

TYP	START	ENDE	NAME	BESCHREIBUNG
Gen	29	50	UF	Primer
Region	34	1542	Ubi-int	Promotor
Gen	599	618	UF1	Primer
Region	1021	1540	Intron	Intron
Gen	1543	1519	C UR	Primer
Region	1603	1856	Nos-T	Nos-Terminator
Region	2673	3533	Amp	ORF-1 Ampicillin Resistenzgen
Region	4292	3576	C ColE1	Ori ColE1

### 4.3.2.2 p6D35S

Tabelle 27 Plasmid p6D35S

TYP	START	ENDE	NAME	BESCHREIBUNG
Region	59	844	Pd35S	2x35S Promotor
Region	871	1896	HPT	Hygromycin Resistenzgen
Region	1921	2122	T35S	CaMV Terminator
Region	2295	2318	RB	Right T-DNA Border
Region	2853	3550	ColE1	Replikationsursprung ColE1
Region	4099	7804	pVS1 Ori	Replikationsursprung pVS1
Region	7988	8998	Sm/Sp	Streptomycin Resistenzgen
Region	9519	9542	LB	Left T-DNA Border

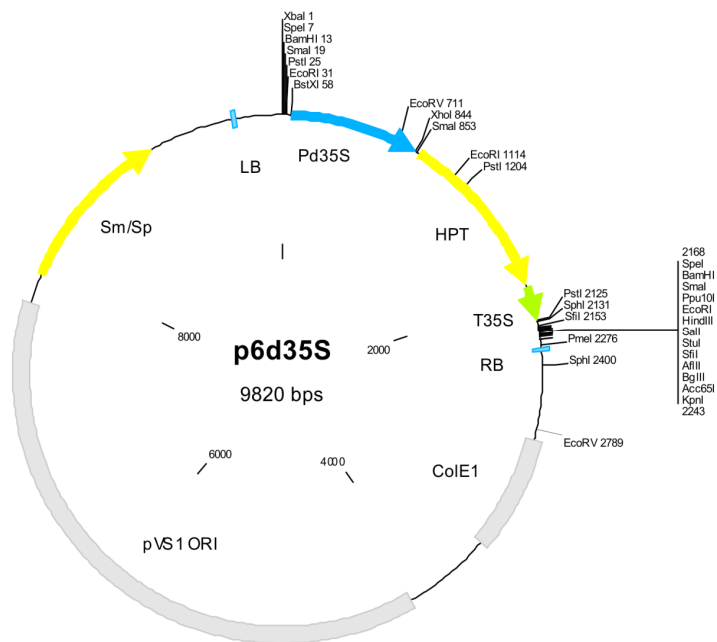


Abbildung 54: Plasmid p6D35S

## 4.4 Oligonukleotide

### 4.4.1 Oligonukleotide für die Herstellung eines synthetischen Codon-veränderten *phyC*-Gens

**Tabelle 28:** Oligonukleotide für die Ligation des Triplett-veränderten Phytasegens *phyC<sub>cop</sub>* von *B. amyloliquefaciens* FZB45 Genbank Nr. AY055220

NAME	DNA-SEQUENZ
PHY1	gCCTgCAgAAgCATAAgCTgTCCgACCCgTAC- CACTTCACCgTgAACgCCgCCgCggAgACgAgCCCgTTgA- CACCgCgggCgACgCCgCggACgACCCAg
PHY2	CCATCTggCTCgACCCTAAgAACCCgCAgAACAgCAAgCTgATCACgACCAA- CAAgAAgTCgggCCTCgTggTCTACTCCCTggAggggAAgACCCTACA
PHY3	CTCCTACCATAcggggAAgCTgAACAAgTggACATCCggTACgACTTCCCAC TCAACggCAAgAAggTggACATCgCCgCCgCCTCCAACCgCTCCgAg
PHY4	ggCAAgAACACCATCgAAATCTACgCCATCgACggCAAgAATgggACTCTCCA gTCCATCACCgACCCTgACCgCCCCATCgCCTCCgCgATCgACgAgg
PHY5	TgTACggCTTCTCCCTgTACCACTCgCAgAAgACgggCAAgTACTACgCgATg gTgACAggCAAggAgggCgAgTTCgAgCAgTACgAgCTgAACgCCgA
PHY6	CAAgAACggCTACATCTCggggAAgAAggTCCgCgCgTTCAAgATgAACTCCC AgACggAggggATggCCgCggACgACgAgTACggCAgCCTgTACATC
PHY7	gCCgAggAggACgAggCgATCTggAAgTTCAGCgCCgAgCCTgACggTgggAg CAACggCACTgTCATCgACAgggCCgACgggCggCACCTCACCCCCg
PHY8	ACATCgAgggCCTCACgATCTACTACgCCgCggACggCAAggggTATCTCCTg gCCTCCAgCCAgggCAACTCCAgCTACgCgATCTACgAgCgCCAggg
PHY9	CCAgAACAAgTACgTggCCgACTTCCAgATCACCCgACgggCCCgAgACCgACg ggACCTCCgACACCgACgggATCgACgTgCTgggCTTCggCCTCggC
PHY10	CCggAgTACCCATTcggCCTgTTCgTggCCCAggACggCgAgAACATCgACCA CgggCagAAggTCAACCAgAACTTCAAgATggTCCCgTgggAgCgCA
PHY11	TCgCggACAAgATCggCTTCCATCCCCAggTgAACAAgCAggTggACCCgCgC AAgCTCACCCgACAggTCgggCAAgTAAgAgCTCgC
PHY12	CggAgCTCTTACTTgCCCgACCTgTCggTgAgCTTgCgCgggTCCACCTgCT
PHY13	TgTTCACCTggggATggAAgCCgATCTTgTCCgCgATgCgCTCCCACgggACC ATCTTgAAgTTCTggTTgACCTTCTgCCCgTggTCgATgTTCTCgCC
PHY14	gTCCTgggCCACgAACAggCCgAATgggTACTCCgggCCgAggCCgAAgCCCA gCACgTCgATCCCgTCggTgTCggAggTCCCgTCggTCTCgggCCCg
PHY15	TCggTgATCTggAAgTCggCCACgTACTTgTTCTggCCCTggCgCTCgTAgAT CgCgTAgCTggAgTTgCCCTggCTggAggCCAggAgATACCCCTTgC

PHY16	CgTCCgCggCgTAgTAgATCgTgAggCCCTCgATgTCgggggTgAggTgCCgC CCgTCggCCCTgTCgATgACAgTgCCgTTgCTCCCACCgTCAggCTC
PHY17	ggCgCTgAACTTCCAATCgCCTCgTCCTCCTCggCgATgTACAggCTgCCgT ACTCgTCgTCCgCggCCATCCCCCTCCgTCTgggAgTTCATCTTgAAC
PHY18	gCgCggACCTTCTTCCCCgAgATgTAgCCgTTCTTgTCggCgTTCAgCTCgTA CTgCTCgAACTCgCCCTCCTTgCCTgTCACCATCgCgTAgTACTTgC
PHY19	CCgTCTTCTgCgAgTggTACAgggAgAAgCCgTACACCTCgTCgATCgCggAg gCgATggggCggTCAgggTCggTgATggACTggAgAgTCCCATTCTT
PHY20	gCCgTCgATggCgTAgATTTcGATggTgTTCTTgCCCTCggAgCggTTggAgg CggCggCgATgTCCACCTTCTTgCCgTTgAgTgggAAgTCgTACCgg
PHY21	ATgTCCACATTgTTCAgCTTCCCCgTATggTAggAgTgTAgggTCTTCCCCCTC CAgggAgTAgACCACgAggCCCgACTTCTTgTTggTCgTgATCAGCT
PHY22	TgCTgTTCTgCgggTTCTTAgggTCgAgCCAgATggCTgggTCgTCCgCggCg TCgCCCgCggTgTCAACgggCTCggTCTCCgCggCggCgTTCACggT
PHY23	gAAgTggTACgggTCggACAgCTTATgCTTCTgCAgCg

#### 4.4.2 Oligonukleotide als PCR-Primer

**Tabelle 29:** PCR-Primer für die Klonierung von *phyC* in den Vektor pMA für die Expression in *Nicotiana tabacum*

BEZEICH- NUNG	SEQUENZ 5'→3'	SCHNITTSTELLE	POSITION ZUM TRANSKRIPTIONSST ART	PLASMID
KR8	ggagatctccaagcata agetgtctgatcc	<i>Bgl</i> III	+58 bis +87 <i>phyC</i> AY055220	pMA
KR9	cgtgtctgacttatttcc gcttctgtcggtcag	<i>Sal</i> I	+1090 bis +1046 <i>phyC</i> AY055220	pMA

**Tabelle 30:** PCR-Primer für die Klonierung von *phyK* in den Vektor pMA für die Expression in *Nicotiana tabacum*

BEZEICH- NUNG	SEQUENZ 5'→3'	SCHNITTSTELLE	POSITION ZUM TRANSKRIPTIONSST ART	PLASMID
RS1	ctgcactcaggatcctc gcagactggcag	<i>Bam</i> HI	+72 bis +92 <i>phyK</i> AY091638.1	pMA
RS2	cgggataccctacggcag gacctggctaccg	<i>Bam</i> HI	+1187 bis +1156 <i>phyK</i> AY091638.1	pMA

**Tabelle 31:** Primer für die Fusion von *phyC<sub>cop</sub>* mit verschiedenen Signalpeptiden für die Expression in *Hordeum vulgare*

BEZEICHNUNG DES OLIGONUKLEOTIDS	SEQUENZ 5'→3'	SCHNITT-STELLE	FUNKTION
Primer für die Fusion mit dem Signalpeptid der Endochitinase <i>chi26</i> aus <i>Hordeum vulgare</i>			
SPTHeNUP	cttctgcagatgagatcgc tcgcggtgg	<i>Pst</i> I	Vorwärtsprimer für das Signalpeptid HvChi26 Gen Bank: ABR28057
3'HVChi26phy	gacagcttatgcttgccgc gcgccg		Rückwärtsprimer 3'Linker für Signalpeptid HvChi26 Gen Bank: ABR28057 zum <i>phyC<sub>cop</sub></i>
5'HVChi26phy	cggcgcgcggcaagcat aaagtgc		5'Linker für phyC zum Signalpeptid HvChi26
Primer für die Fusion mit dem Signalpeptid der Oxalatoxidase <i>OxOA</i> aus <i>Hordeum vulgare</i>			
Y13	gaactgcagatgggttact ctaaaaacctaggggc	<i>Pst</i> I	Vorwärtsprimer für Signalpeptid von HvOxOa Gen-Bank: Y14203.1
3'oxoAphy	gacagcttatgcttagcca tgatggccg		Rückwärtsprimer 3'Linker für Signalpeptid HvOxOa GenBank: Y14203.1 zum <i>phyC<sub>cop</sub></i>
5'oxoAphy	cggccatcatggctaagc ataagtgc		5'Linker für phyC zum Signalpeptid HvOxOa
Primer für die Fusion mit dem Signalpeptid des Proteinaseinhibitors II aus <i>Solanum tuberosum</i>			
5'PIIISP	ctgcagatggatgttcaca aggaag	<i>Pst</i> I	Vorwärtsprimer für Signalpeptid von Gen Bank: X04118.1
3'PIIISPphy	gacagcttatgcttgatcc ccaattcgg		Rückwärtsprimer für Signalpeptid von Gen Bank: X04118.1 und 3'Linker zum <i>phyC<sub>cop</sub></i>
5'PIIISPphy	ccgaattgggatcaagc ataagtgc		5'Linker für <i>phyC<sub>cop</sub></i> zum Signalpeptid
Rückwärtsprimer für alle Konstrukte mit <i>phyC<sub>cop</sub></i>			
phyrv	gcgagctcttactgccc acc	<i>Sac</i> I	Rückwärtsprimer für alle Konstrukte mit <i>phyC<sub>cop</sub></i>

**Tabelle 32:** PCR-Primer für die Klonierung von *phyC<sub>cop</sub>* mit Signalpeptid in den Vektor pUIB

BEZEICHNUNG DES OLIGONUKLEOTIDS	SEQUENZ 5'→3'	SCHNITT-STELLE	FUNKTION
Primer für die Klonierung des mit dem Signalpeptid von <i>chi26</i> fusionierten <i>phyC<sub>cop</sub></i> in den			

BEZEICHNUNG DES OLIGONUKLEOTIDS	SEQUENZ 5'→3'	SCHNITTSTELLE	FUNKTION
Vektor pUIB			
5'HVpUIB	cagagatctatgagatcgctcggtggtg	<i>Bgl</i> II	Vorwärtsprimer für Signalpeptid GenBank: ABR28057 für pUIB
3'phy45cop		<i>Sal</i> I	Rückwärtsprimer
Primer für die Klonierung des mit dem Signalpeptid von <i>OxOA</i> fusionierten <i>phyC<sub>cop</sub></i> in den Vektor pUIB			
5'oxpUIB	cagagatctatgggttactctaaaaacctaggggc	<i>Bgl</i> II	Vorwärtsprimer für Signalpeptid HvOxOa GenBank: Y14203.1 für pUIB
3'phy45cop		<i>Sal</i> I	Rückwärtsprimer
Primer für die Klonierung des mit dem Signalpeptid des Proteinaseinhibitor II fusionierten <i>phyC<sub>cop</sub></i> in den Vektor pUIB			
5'PISpUIB	accagatctatggatgttca caaggaagttaatttcg	<i>Bgl</i> II	Vorwärtsprimer Signalpeptid Gen Bank X04118.1 für pUIB
3'phy45cop		<i>Sal</i> I	Rückwärtsprimer

Tabelle 33: PCR-Primer für die Klonierung von *phyC<sub>cop</sub>* in *Nicotiana tabacum*

BEZEICHNUNG	SEQUENZ 5'→3'	SCHNITTSTELLE	PLASMID
5'PIIISP35S	caggggtaccatggatgttcacaaggaagt	<i>Xba</i> I	pMA
5'HVChi2635S	caggggtaccatgagatcgctcggtggtg	<i>Xba</i> I	pMA
5óxoA35S	caggggtaccatgggttactctaaaaacct	<i>Xba</i> I	pMA
3'pMAphy45cop	ctagtctagattacttgcacgacctgtcgg	<i>Kpn</i> I	pMA

## 4.5 Enzyme für gentechnische Arbeiten

### 4.5.1 Restriktionsenzyme

Tabelle 34: Restriktionsendonukleasen

RESTRIKTIONSENZYM	ERKENNUNGSSEQUENZ	ORGANISMUS
<i>Bam</i> HI	5'-G↓GATCC-3' 3'-CCTAG↑G-5'	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H (ATCC 49763)
<i>Bgl</i> II	5'-A↓GATCT-3' 3'-TCTAG↑A-5'	<i>Bacillus globigii</i> (ATCC 49760)
<i>Eco</i> RI	5'-G↓AATTC-3' 3'-CTTAA↑G-5'	<i>E. coli</i> RY13 (R.N. Yoshimori)



<i>NotI</i>	5'-GC↓GGCCGC-3' 3'-CGCCGG↑CG-5'	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i> (ATCC 14630)
<i>SaII</i>	5'-G↓TCGAC-3' 3'-CAGCT↑G-5'	<i>Streptomyces albus</i> G (ATCC 49789)
<i>KpnI</i>	5'-GGTAC↓C-3' 3'-C↑CATGG-5'	<i>Klebsiella pneumoniae</i> OK8 (ATCC 49790)
<i>SphI</i>	5'-GCATGC-3' 3'-CGTACG-5'	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i> (NRRL B-3559)
<i>SfiI</i>	5'-GGCCNNNN↓NGGCC-3' 3'-CCGGN↑NNNNCCGG-5'	<i>Streptomyces fimbriatus</i> (ATCC 15051)
<i>SacI</i>	5'-GAGCT↓C-3' 3'-C↑TGCAG-5'	<i>Streptomyces achromogenes</i> (ATCC 12767)
<i>PstI</i>	5'-CTGCA↓G-3' 3'-G↑ACGTC-5'	<i>Providencia stuartii</i> 164 (ATCC 49762)
<i>NdeI</i>	5'-CA↓TATG-3' 3'-GTAT↑AC-5'	<i>Neisseria denitrificans</i> (NRCC 31009)
<i>XhoI</i>	5'-C↓TCGAG-3' 3'-GAGCT↑C-5'	<i>Xanthomonas holcicola</i> (ATCC 13461)
<i>ScaI</i>	5'-AGT↓ACT-3' 3'-TCA↑TGA-5'	<i>Streptomyces caespitosus</i> (H. Takahashi)
<i>HpaI</i>	5'-GTT↓AAC-3' 3'-CAA↑TTG-5'	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> (ATCC 49669)

#### 4.5.2 DNA-modifizierende Enzyme

**Tabelle 35:** weitere Enzyme für molekularbiologische Arbeiten

ENZYM	FUNKTION	ORGANISMUS	HERSTELLER/PROTOKOLL
Cloned-Pfu-Polymerase	DNA-Polymerase	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Stratagene
T4-DNA-Ligase	DNA-Ligase	Bakteriophage T4	Fermentas GmbH
Shrimp Alkaline Phosphatase	Phosphatase	<i>Pandalus borealis</i>	Fermentas GmbH
T4-Polynucleotide Kinase	Kinase	Bakteriophage T4	Fermentas GmbH

## 4.6 Medien, Lösungen, Antibiotika

### 4.6.1 Puffer, Lösungen, Substrate

**Tabelle 36:** Puffer für genetische Arbeiten

BEZEICHNUNG	ZUSAMMENSETZUNG
10 x Reaktionspuffer für Pfu-Polymerase	200 mM Tris-HCl (pH 8,8), 100 mM KCl, 100 mM (NH) <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> , 20 mM MgSO <sub>4</sub> , 1% Triton X-100, 1 mg/ml BSA
10 x TE	100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA pH 8,0
6 x DNA-Ladepuffer	30 % Glycerin, 10 mM EDTA (pH 8,0), 0,25 % Bromphenolblau
1 x TAE	40 mM Tris, 1,1 ml/l Eisessig, 1 mM EDTA, 0,5 µg/l Ethidiumbromid

**Tabelle 37:** Antibiotikastocklösungen

ANTIBIOTIKUMLÖSUNG	KONZENTRATION DER STOCKLÖSUNG [MG/ML]
Ampicillin	100 mg/ml
Combactam	100 mg/ml
Kanamycin	50 mg/ml
Rifampicin	100 mg/ml
Ticarcillin	100 mg/ml
Chloramphenicol	20 mg/ml

**Tabelle 38:** Medien für die Bakterienkultivierung

MEDIUMBEZEICHNUNG	MENGE/L
TBY	20 g Trypton 10 g Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1 l dest. H <sub>2</sub> O mit NaOH auf pH 7.0
LB	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 l dest. H <sub>2</sub> O mit NaOH auf pH7.0
LB-Agarplatten	Wie LB und zusätzlich 15 g/l Bacto-Agar-Agar
YEB	5 g Fleischextrakt 1 g Hefeextrakt 1 g Pepton 5 g Saccharose ad 900 ml dest. H <sub>2</sub> O mit NaOH auf pH 7.0 einstellen nach dem Autoklavieren: 50 ml 1 M MgSO <sub>4</sub> und 50 ml MgCl <sub>2</sub> dazugeben
YEB-Agarplatten	Wie YEB und zusätzlich 15 g/l Bacto-Agar-Agar

MG	5 g Mannitol 1 g L-Glutaminsäure 250 mg KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mg NaCl 100 mg MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 1 µg Biotin (sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren hinzufügen) 5 g Trypton 2,5 g Hefeextrakt ad 1 l dest. H <sub>2</sub> O
MG-Agarplatten	Wie MG mit zusätzlich 15 g/l Bacto-Agar-Agar

**Tabelle 39:** Medien und Lösungen für das Wachstum und die Regeneration von *Nicotiana tabacum*

MEDIUMBEZEICHNUNG	MENGE	REFERENZ
MS	4,4 g MS-Medium 30 g Saccharose ad 1 l dest. H <sub>2</sub> O	Murashige & Skoog Medium (MS-Medium) (DUCHEFA: Micro and Macro elements including Vitamins) Murashige T. and Skoog F., Physiol. Plant, 15, 473 (1962)
MS-Medium-Agarplatten	4,4 g MS-Medium 30 g Saccharose 8 g Agar-Agar 0,05 g 6-Benzylaminopurin ad 1 l dest. H <sub>2</sub> O	

## 4.7 Geräte

Tabelle 40: Geräte

GERÄTEART	GERÄTEBEZEICHNUNG	HERSTELLER
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus instruments
Kühl-Tischzentrifuge	Mikro 200R	Hettich
Ultrazentrifuge	Sorvall RC-5B	Du Pont
DNA-Elektrophoresekammer	Agagel Mini	Biometra GmbH
Proteinelektrophoresekammer	Mini-Protean-2 Mini-Protean-3	Biorad Laboratories Inc.
FPLC	LCC-501 Plus	Pharmacia Biotech
Vortexer	VF2	IKA-Labortechnik
Magnetrührer mit Heizplatte	IKA RCT basic	IKA-Labortechnik
Vakuumpumpe	260 BR	Biorad Laboratories Inc.
Swing-out-Zentrifuge	Sigma 3K10	Sigma-Laborzentrifugen GmbH
Mikrotiterplattenreader	Multiskan Ascent	Thermo scientific
Geldokumentationsanlage	Gene genius	Syngene
Laborschüttler	Inkubationsschüttler	HT Infors AG
Brutschrank		WTC-Binder Labortechnik GmbH
PCR-Maschine	PTC-100	MJ Research Inc.
PCR-Maschine	Gene Amp 2700	Applied Biosystems
Phosphoimager	FX-ProPlus	Biorad Laboratories Inc.
Screen-Eraser	K	Biorad Laboratories Inc.
Elektroporationsanlage	Gene Pulser	Biorad Laboratories Inc.
Photometer	Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech
Heizblock	QBT2	Grant
Heizblock	HBT2-131	HLC
Wasserbad	Haake-W13	Haake Fusions
Semi-Dry-Blotter	Transblot-SD	Biorad Laboratories Inc.
Tiefkühltruhe -80 °C		GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH
Sicherheitswerkbank		
pH-Meter	761 Calimatic	Knick

Wipptisch	WT 17	Biometra biomedizinische Analytik GmbH
Präzisionswaage	PT 2100	Sartorius AG
Analysenwaage		Sartorius AG
Kugelmühle	Schwingmühle MM200	Retsch GmbH
Mixer	Commercial Blendor	Waring
Durchlichtscanner	Epson Expression 1680 Model EU-35	Epson Deutschland GmbH



## 5 Methoden

### 5.1 Mikrobiologische Methoden

Alle verwendeten Nährmedien für die Kultivierung der Bakterienstämme wurden in Tabelle 38 aufgeführt.

#### 5.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Anzucht der Zellen in LB-Flüssigkultur erfolgte unter Schütteln (200 rpm) bei 37 °C für 16h. Nach Inkubation auf LB-Agarplatten bei 37°C über Nacht wurde die Kultur bei 4°C aufbewahrt. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte photometrisch (Ultrospec 2000) gegen ein entsprechendes Medium bei einer Wellenlänge von  $\lambda=600$  nm.

#### 5.1.2 Kultivierung von *Agrobacterium tumefaciens* pGV2260

Zellen von *Agrobacterium tumefaciens* pGV2260 wurden in YEB-Flüssigkultur bei 28 °C mit 200 rpm für 16h geschüttelt. Die Stämme wurden ebenfalls auf YEB-Agarplatten bei 28 °C über Nacht bebrütet. Die Zelldichten wurden photometrisch bei 600 nm Wellenlänge gemessen.

#### 5.1.3 Kultivierung von *Agrobacterium tumefaciens* AGL1

Zellen von *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 wurden in MG-Flüssigkultur bei 28 °C mit 200 rpm für 16h geschüttelt. Außerdem wurden die Stämme auf MG-Agarplatten bei 28 °C über Nacht bebrütet. Die Zelldichten wurden photometrisch bei 600 nm Wellenlänge bestimmt.

#### 5.1.4 Kultivierung von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45

Die Anzucht der Zellen in TBY- Flüssigkultur erfolgte bei 37 °C unter Schütteln (200 rpm) für 16 h. Nach Anzucht bei 37 °C über Nacht auf LB-Agarplatten wurden die Zellen bei RT aufbewahrt. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda=600$  nm.

### 5.1.5 Kultivierung von *Arxula adeninivorans*

Der, das *phyK*-Gen tragende *Arxula*-Stamm wurde, analog der von (Herter 2009) beschriebenen Methode, kultiviert und die Proteinexpression durchgeführt.

## 5.2 Kultivierung von Pflanzen

### 5.2.1 Kultivierung von *Nicotiana tabacum*

Die Kultivierung von *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN erfolgte in Gewebekultur unter sterilen Bedingungen auf Murashige Skoog Medium, mit 2 %, (wt/vol) Saccharose, in einem 16 h Licht- und 8 Stunden Dunkelrhythmus (Lichtintensität ca. 250  $\mu\text{mol Quanten m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Im Gewächshaus wurden die Pflanzen auf Einheitserde (ED-73 DIN 11540-80T) bei 16 h Licht mit Zusatzbeleuchtung (ca. 300  $\mu\text{mol Quanten m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und 8 h Dunkelheit gehalten. Die Temperatur betrug während der Lichtphase 25 °C und während der Dunkelphase 18 °C.

#### 5.2.1.1 Wachstumsversuche mit *Nicotiana tabacum*

Mit den Konstrukten pMA-P1 und pMA-R1 transformierte *Nicotiana tabacum* Pflanzen der T<sub>1</sub>-Generation wurden in Gewebekultur unter sterilen Bedingungen vermehrt und jeweils vier identische Klone einer Expressionslinie für jede Wachstumsbedingung eingesetzt. Als Kontrolle wurden für jede Wachstumsbedingung 20 Wildtyppflanzen in Gewebekultur unter sterilen Bedingungen vermehrt und für den Wachstumsversuch eingesetzt.

Dazu mussten die Pflanzen im 5- Blattstadium aus dem MS-Agar vorsichtig entfernt und mit destilliertem Wasser von Agarrückständen befreit werden. Nachfolgend waren die Pflanzen in 14 cm Töpfe mit Quarzsand zu überführen und zur Anpassung und Reduktion eventueller Phosphorrückstände aus dem Medium für 7 Tage im Gewächshaus mit destilliertem Wasser zu kultivieren. Der verwendete Quarzsand war gewaschen und hatte eine Körnung von 0,4-0,7 mm. Die Wasserhaltekapazität betrug 201 ml/ kg und der Gehalt an pflanzenverfügbarem Phosphor 1,0 mg/kg. Von dem Quarzsand wurden 1500 g in Plastiktöpfe mit einer Höhe von 10 cm und einem Durchmesser von 14 cm gefüllt. Anschließend wurde für 30 Tage mit Nährlösung mit Na-Phytat oder KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> als alleiniger P-Quelle gegossen. Pro Woche erhielten die Pflanzen 300 ml Nährlösung, der restliche Wasserbedarf wurde mit destilliertem Wasser auf 100 % Wasserhaltekapazität ergänzt.



Die Zusammensetzung der Nährlösungen wurde an die von J. A. L. W. Knop (Knop 1884) beschriebenen angelehnt. Die Stammlösungen für die Nährlösungen können der

Tabelle 42 und der Tabelle 43 entnommen werden. Die Pflanzen wurden während des Versuchs im Gewächshaus bei 16 h Licht mit Zusatzbeleuchtung (ca. 300  $\mu\text{mol Quanten m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) und 8 h Dunkelheit gehalten. Die Temperatur hatte während der Lichtphase 25 °C und während der Dunkelphase 18 °C betragen.

**Tabelle 41:** Stammlösungen zur Herstellung der einzelnen Nährlösungen für *Nicotiana tabacum*.

STOCKLÖSUNGEN			
I	II	III	IV
200 g Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 24 g KCl dest. H <sub>2</sub> O ad. 1 L	50 g KCl dest. H <sub>2</sub> O ad. 1 L	50 g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O dest. H <sub>2</sub> O ad. 1 L	5 %ige Fe-EDTA-Lösung dest. H <sub>2</sub> O ad. 1 L
A-Z-LÖSUNG			
Komponente		[mg]	
KJ		25	
LiCl		25	
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O		50	
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O		100	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		550	
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>		50	
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O		350	
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O		50	
KBr		25	
(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>		50	
Für die A-Z-Lösung 800 ml dest. H <sub>2</sub> O vorlegen und alle Komponenten nacheinander lösen.			
Lösungen für die Bereitstellung der jeweiligen P-Quelle			
Komponente		[mg/ ml]	
100 mM Na-Phytat Dodecasalz (Sigma Aldrich)		92,38	
100 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		13,61	
Die entsprechende Menge in dest H <sub>2</sub> O lösen und den pH-Wert auf pH 5,2 bzw. 6,8 einstellen.			

**Tabelle 42:** Zusammensetzung der Nährlösung mit Phytat als einziger P-Quelle.

KOMPONENTE	MENGE [ML]
dest. H <sub>2</sub> O	4000
Stocklösung I	25
Stocklösung II	25
Stocklösung III	25
Stocklösung IV	5
A-Z-Lösung	5
100 mM Na-Phytat-Lösung Dodecasalz (Sigma Aldrich)	2,5
Alle Komponenten werden gut miteinander vermischt und der pH-Wert wird auf 6,8 für pMA-P1 bzw. 5,2 für pMA-R1 mit KOH bzw. HCl eingestellt. Anschließend wird auf 5 L mit dest. H <sub>2</sub> O aufgefüllt und der pH-Wert kontrolliert und gegebenenfalls nachjustiert.	

**Tabelle 43:** Zusammensetzung der Nährlösung mit KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> als einziger P-Quelle.

KOMPONENTE	MENGE [ML]
dest. H <sub>2</sub> O	4000
Stocklösung I	25
Stocklösung II	25
Stocklösung III	25
Stocklösung IV	5
A-Z-Lösung	5
100 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,5 für pH 6,8 12,5 für pH 5,2
Alle Komponenten werden gut miteinander vermischt und der pH-Wert wird auf 6,8 für pMA-P1 bzw. 5,2 für pMA-R1 mit KOH bzw. HCl eingestellt. Anschließend wird auf 5 l mit dest. H <sub>2</sub> O aufgefüllt und der pH-Wert kontrolliert und gegebenenfalls nachjustiert.	

### 5.2.2 Kultivierung von *Hordeum vulgare* L. var. Golden promise

*Hordeum vulgare* ist im Gewächshaus auf Einheitserde (ED-73 DIN 11540-80T) bei 16 h Licht mit Zusatzbeleuchtung (ca. 300  $\mu\text{mol Quanten m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und 8 h Dunkelheit gehalten worden. Die Temperatur hatte während der Lichtphase 20 °C und während der Dunkelphase 16 °C betragen.

### 5.2.2.1 Wachstumsversuche mit *Hordeum vulgare*

#### 5.2.2.1.1 Wachstumsversuch auf Quarzsand

Der für den Wachstumsversuch bei pH-Wert 5,3 verwendete Boden bestand zu 89 % aus Quarzsand, 10 % aus Löss und 1 % Torf. Die Wasserhaltekapazität betrug 228 ml/ kg und der Gehalt an pflanzenverfügbarem Phosphor 2,5 mg/kg. Die Zusammensetzung des Bodens für den Wachstumsversuch bei einem pH-Wert von 7,3 war 89,68 % Quarzsand, 10 % Löss und 0,32 % Perlit. Die Wasserhaltekapazität wurde mit 225 ml/ kg und der Gehalt an pflanzenverfügbarem Phosphor zu 1,5 mg/ kg bestimmt. Der bei 40 °C für 72 h getrocknete Boden wurde vor der Mischung und Verwendung durch ein 2 mm Sieb gestrichen, 650 g davon in zylindrische Töpfe mit einer Höhe von 18 cm und einem Durchmesser von 5 cm gefüllt. Die Nährstoffe (Tabelle 44) wurden getrennt als Nährlösung I, II und III in destilliertem Wasser gelöst und jedem Topf, entsprechend der Menge an Quarzsand (650 g), zugefügt und je nach Variante der P-Quelle die Nährlösung III eingesetzt. Der pH-Wert der jeweiligen Lösung war vorher mit HCl bzw. KOH auf den pH-Wert von 5,3 bzw. 7,3 justiert.

**Tabelle 44:** Nährstoffe für den Wachstumsversuch mit *Hordeum vulgare* auf Quarzsand

NÄHRSTOFF	MG NÄHRSTOFF/ KG QUARZSAND	VERWENDETER FESTSTOFF
<b>NÄHRLÖSUNG I</b>		
Kalzium	72	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Kalium	63	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Magnesium	2	MgSO <sub>4</sub>
Stickstoff	33	aus Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Schwefel	33	aus K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub> , MnSO <sub>4</sub> , ZnSO <sub>4</sub> , CuSO <sub>4</sub>
<b>NÄHRLÖSUNG II</b>		
Mangan	4,9	MnSO <sub>4</sub>
Zink	2,9	ZnSO <sub>4</sub>
Kupfer	0,5	CuSO <sub>4</sub>
Bor	0,1	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
Kobalt	0,1	CoCl <sub>2</sub>
Molybdän	0,1	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>
<b>NÄHRLÖSUNG III</b>		
Phosphor Variante 1	20	Na-Phytat Dodecasalz (Sigma Aldrich)

ODER		
Phosphor Variante 2	20	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
ODER		
Phosphor Variante 3	0	im Boden vorhanden

Der Wachstumsversuch verlief unter unsterilen Bedingungen im Gewächshaus mit 16 h Licht bei Zusatzbeleuchtung (ca. 300  $\mu\text{mol Quanten m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und 8 h Dunkelheit. Die Temperatur betrug während der Lichtphase 20 °C und während der Dunkelphase 16 °C.

### 5.3 Gentechnische Methoden

#### 5.3.1 PCR

##### 5.3.1.1 Standard-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion diente der Vermehrung von DNA-Abschnitten aus Plasmid- bzw. chromosomaler DNA nach Saiki *et al.*, 1988. Zur Amplifizierung wurde die Pfu-Polymerase genutzt, welche eine 3'→5' proofreading-Exonukleaseaktivität besitzt.

##### 5.3.1.1.1 Amplifikation des Phytasegens aus dem Ligationsansatz

Zur Fusionierung der Signalpeptide mittels SOE-PCR an die veränderte Phytase-DNA-Sequenz wurde ein Linker mit Hilfe der Standard-PCR an das 5'-Ende des Ligationsproduktes angefügt. Die eingesetzten Linker sind drei verschiedene Vorwärtsprimer, bestehend aus einem kurzen Sequenzabschnitt des 3'-Endes des Signalpeptids und des 5'-Endes des Phytasegens. Diese Vorwärtsprimer sowie der Rückwärtsprimer phyrv wurden in Tabelle 45 aufgeführt.

**Tabelle 45:** PCR-Primer für die Amplifikation des Phytasegens aus dem Ligationsansatz

PRIMERNAME	SEQUENZ 5'→3'	FUNKTION
5'HVChi26phy	cggcgcgcggaagcataagctgtc	Vorwärtsprimer 5'Linker für das HVChi26 Signalpeptid
5óxoAphy	cggccatcatggctaagcataagctgtc	Vorwärtsprimer 5'Linker für das HvOxOa-Signalpeptid

5' PIIISPphy	ccgaattggggatcaagcataagctgtc	Vorwärtsprimer 5' Linker für das Signalpeptid Gen Bank: X04118.1
phyrv	gcgagctcttacttgcccgacc	Rückwärtsprimer <i>phyC</i>

Die Pipettierung des PCR-Ansatzes erfolgte entsprechend dem Schema nach Tabelle 46.

**Tabelle 46:** Pipettierschema Standard-PCR

KOMPONENTE	VOLUMEN [ $\mu$ L]
Ligationsproduktmix	2,0
dNTPs (2 mM)	5,0
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,75
10 x DNA-Polymerasepuffer 200 mM Tris-HCl pH 8,4 500 mM KCl	5,0
cloned pfu-DNA-Polymerase (Stratagene) (2500 U/ml)	1,0
Vorwärtsprimer abhängig von Signalpeptid siehe Tabelle 45 (100 $\mu$ M)	0,4
Rückwärtsprimer siehe Tabelle 45 (100 $\mu$ M)	0,4
bidest. H <sub>2</sub> O	34,45

Für die Amplifikation wurde das in Tabelle 47 gezeigte PCR-Programm verwendet.

**Tabelle 47:** Standard-PCR-Programm

TEMPERATUR [ $^{\circ}$ C]	ZEIT	ZYKLEN
97	2 min	1
97	1 min	25 Wiederholungen
60	45 s	
72	2 min	
72	8 min	1

### 5.3.1.2 SOE-PCR

Mit Hilfe der SOE-PCR (*spliced-overlap-extension*) können zwei DNA-Fragmente fusioniert werden, die um mindestens 20 bp überlappen. Das Verfahren wurde dazu benutzt die Phytasegene mit den entsprechenden Signalpeptiden zu fusionieren. Dabei erfolgte in der ersten PCR die Amplifizierung sowohl des Signalpeptids als auch des Phytasegens aus

Vektoren bzw. dem Ligationsproduktmix. Anschließend wurden die PCR-Fragmente über ein Agarosegel und mit dem QiaexII-Extraction Kit von Qiagen nach Herstellerangaben gereinigt. Die Fusionierung der Fragmente geschah schließlich in einer zweiten PCR. Die PCR-Programme wurden in der Tabelle 48 aufgeführt.

**Tabelle 48:** PCR-Programme der SOE-PCR

PROGRAMM	TEMPERATUR [°C]	ZEIT	ZYKLEN
1	97	2 min	1
	97	30 s	5 Wiederholungen
	55	1 min	
	72	2 min	
	72	5 min	1
2	97	2 min	20 Wiederholungen
	97	30 s	
	60	45 s	
	72	2 min	
	72	5 min	

### 5.3.2 Restriktion

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifische DNA-Sequenzen erkennen und den DNA-Doppelstrang an dieser Stelle aufschneiden. Jedes Restriktionsenzym hat seine spezifische Erkennungssequenz.

### 5.3.3 Dephosphorylierung

Die Dephosphorylierung von DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe der Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) von Fermentas nach Herstellerangaben. Die SAP katalysiert die Abspaltung von 5'-und 3'-Phosphatgruppen von DNA, RNA und Nukleotiden.

### 5.3.4 Phosphorylierung

#### 5.3.4.1 Standard-Phosphorylierung

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase (T4 PKN) phosphoryliert. Die T4 PKN katalysiert den Transfer und Austausch von  $\gamma$ -Phosphate des ATPs zur 5'-OH

Gruppe von einzel- und doppelsträngiger DNA, RNA, Oligonukleotiden oder Nukleoside 3'-monophosphaten.

### 5.3.5 Ligation

#### 5.3.5.1 Standard-Ligation

Das Enzym Ligase verknüpft 5'Phosphatgruppen mit 3'OH-Enden unter Anwesenheit von Cofaktoren wie ATP und  $\text{NAD}^+$  und ermöglicht so das Einfügen von DNA-Fragmenten in Vektoren. DNA-Ligationen wurden mit Hilfe des DNA Rapid Ligation Kits (Fermentas) nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### 5.3.5.2 Ligation von synthetischer genomischer DNA

Vor der Ligation wurden die 23 Oligonukleotide mit einer Ausgangskonzentration von 100  $\mu\text{M}$  gemischt. Die Endkonzentration des Gemisches betrug für jedes Oligonukleotid 0,4  $\mu\text{M}$ . Für die Ligation der 23 Oligonukleotide wurde der in Tabelle 49 aufgeführte Ligationsansatz erstellt. Zur Ligation wurden die pfu-DNA-Ligase und der dazugehörige 10fach Puffer der Firma Stratagene nach Herstellerangaben herangezogen.

**Tabelle 49:** Ligationsansatz ohne pfu-Ligase

KOMPONENTE	VOLUMEN [ $\mu\text{L}$ ]
Oligogemisch 1-23	5,0
10 x pfu-Ligase-Puffer	5,0
38 $\mu\text{l}$ bidest. $\text{H}_2\text{O}$	38,0

Der Ansatz wurde ohne pfu-DNA-Ligase für 3 min in einem Topf mit Wasser bei 100 °C inkubiert und über Nacht in einem Thermobehälter samt Topf langsam bei Raumtemperatur abgekühlt. Nach der Zentrifugation des Ansatzes wurden diesem, 8 U pfu-DNA-Ligase (2  $\mu\text{l}$ ) zugefügt und bei 55 °C für 1 h inkubiert. Der Ligationsproduktmix diente als Template für die Amplifikation mittels PCR.

### 5.3.6 Transformation

#### 5.3.6.1 Transformation von *Escherichia coli*

Bei –80 °C tief gefrorene  $\text{CaCl}_2$  – kompetente *E. coli* Zellen (200  $\mu\text{l}$ , Stamm DH5 $\alpha$ ) wurden auf Eis aufgetaut und 100  $\mu\text{l}$  als Kontrolle ausgestrichen. Zu den restlichen 100  $\mu\text{l}$  Zel-

len wurden 5-10 µl des Ligationsansatzes steril pipettiert. Nach der Inkubation für 30-60 min auf Eis wurde der Zellenansatz sodann für 90 s einem Hitzeschock bei 42 °C unterzogen. Nach einer weiteren 2-minütigen Inkubationsphase auf Eis wurde zum Ansatz 800 µl Luria Broth Medium zugefügt und das Gemisch für 1 h bei 200 rpm Schüttelfrequenz bei 37 °C inkubiert und anschließend ein Aliquot auf Selektionsmedium ausplattiert.

### **5.3.6.2 Herstellung kompetenter Zellen von *Agrobacterium tumefaciens* pGV2260**

Eine Vorkultur in YEB-Medium wurde mit Selektionsmarker angeimpft und über Nacht bei 28 °C unter Schütteln inkubiert. Damit wurde eine Hauptkultur von 200 ml in YEB-Medium mit Selektionsmarker angeimpft und bei 28 °C unter Schütteln inkubiert bis eine optische Dichte von 0,5 bei 600 nm erreicht wurde und sich die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Die Kultur wurde dann mit 4000 g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert und das gewonnene Pellet anschließend in 20 ml physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und die Zentrifugation wiederholt. Der zweite Waschschrift erfolgte mit 20 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> mit nachfolgender Pelletierung bei 4000 g und 4°C für 20 min. Das Pellet wurde in 2 ml YEB mit 10 % Glycerol aufgenommen und in Aliquots von 200 µl in Eppendorfreaktionsgefäße gefüllt. Zur Lagerung wurde das Material in flüssigem Stickstoff eingefroren. Es ist bei –80 °C bis zu 3 Monaten haltbar.

### **5.3.6.3 Herstellung kompetenter Zellen von *Agrobacterium tumefaciens* AGL1**

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgt analog zu der unter 5.3.6.2 beschriebenen Methode. Allerdings wurden die Zellen in MGL-Medium mit 50 µg/ml Rifampicin, 100 µg/ml Spectinomycin und 100 µg/ml Carbenicillin angezüchtet.

### **5.3.6.4 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens***

#### **5.3.6.4.1 Transformation von pGV2260**

Die kompetenten Zellen wurden rasch aufgetaut und 1-2 µg in 100 µl YEB gelöste DNA dazu gegeben. Der Ansatz wurde für 5 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend aufgetaut und 1 ml YEB-Medium hinzugefügt. Der Transformationsansatz wurde daraufhin für 3 h bei 28 °C unter Schütteln inkubiert und die Zellen nun auf YEB-Platten mit Selektionsmarker ausplattiert und bei 28 °C wiederum inkubiert.



#### 5.3.6.4.2 Transformation von AGL1

#### 5.3.6.5 Transformation von *Nicotiana tabacum*

##### 5.3.6.5.1 Stabile Transformation in das Genom

Die Integration der Konstrukte in *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun erfolgte über die Transformation mit *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. Die Transformation ließ sich nach einer modifizierten Methode nach Horsch (Horsch, Rogers et al. 1985) folgendermaßen durchführen:

Aus einer über Nacht angesetzten Vorkultur von 10 ml wurde die 200 ml Hauptkultur angeimpft und bei 28 °C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden durch 15minütige Zentrifugation bei 4000 g und 15 °C geerntet und mit 200 ml Murashige- und Skoog-Medium aufgenommen. Ein Aliquot der Kultur wurde in eine sterile Petrischale gegeben und frisch von Wildtyp-Tabakpflanzen abgeschnittene Blätter mit entfernter Mittelrippe in der Bakteriensuspension zerkleinert. Die Blattstücken wurden gut abgetropft und anschließend auf Murashige- und Skoog-Agarplatten mit 6-Benzylaminopurin (Cytokinin) aufgelegt und für 2 Tage in einem Lichtraum bei 20 °C inkubiert. Danach wurden die Blätter in MS-Puffer gewaschen und auf neue MS-Platten mit 6-Benzylaminopurin, Ticarcillin und Combactam<sup>®</sup> ausgelegt, um das Wachstum von *Agrobacterium*-Zellen zu hemmen. Als sich nach 7 bis 14 Tagen erste kleine Kalli an den Rändern der Blattstücke regenerierten, wurden die Stücke auf neue MS-Platten mit Kanamycin als Selektionsmarker aufgelegt. Die Blattstücken mussten alle 14 Tage auf frische MS-Platten mit Kanamycin umgebettet werden, um die Antibiotikumkonzentration zu erhalten. Wenn sich Sprößlinge dann nach ca. 8 Wochen aus den selektierten Kalli Sprößlinge regenerierten, wurden diese von den Blattstücken getrennt und auf ein Bewurzlungsmedium mit Naphtylelessigsäure (Auxin) und Kanamycin umgesetzt. Als sich nach 7 bis 14 Tagen Wurzeln bildeten, wurden die Pflänzchen auf Erde umgesetzt und ins Gewächshaus gebracht.

Die verwendeten Lösungen und Medien wurden im Anhang in **Tabelle 59** zusammenfassend dargestellt.

##### 5.3.6.5.2 Transiente Expression

Die mit den Konstrukten pMA-P1 und pMA-R1 transformierten Agrobakterien wurden über Nacht in YEB-Medium mit 50 µg/ ml Rifampicin und Kanamycin als Selektionsmar-

ker bei 28 °C und unter Schütteln mit 200 rpm angezogen. 1 ml der über Nacht Kultur wurde in 50 ml YEB mit 50 µg/ ml Rifampicin, Kanamycin und Ampicillin überführt, dann 500 µl 1 M MES-Puffer pH 5,2 und 10 µl 100 mM Acetosyringone zugesetzt und die Kultur anschließend über Nacht bei 28 °C unter Schütteln mit 200 rpm inkubiert. Nachfolgend wurde mit 3500 rpm bei 4 °C in 50 ml Falcontubes zentrifugiert, das Zellpellet in 10 ml 10 mM MES-Puffer pH 5,2 mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 100 µM Acetosyringone aufgenommen und resuspendiert. Die Trübung des Resuspensats wurde bei 600 nm gemessen, die Zelldichte errechnet und alle Kulturen auf die optische Dichte von 1,0 eingestellt. Im Anschluss wurden die Kulturen für 2-4 h bei RT ohne zu schütteln weiter inkubiert, schließlich die *Nicotiana tabacum* Blätter von ca. 35 Tage alten Pflanzen an der Tabakblattunterseite mit einer Spritze ohne Kanüle infiltriert. Die Probennahme vor der Infiltration erfolgte nach 24, 42, 72 und 120 h mit einem 4er Stanzer.

#### 5.3.6.5.2.1 Transiente Expression unter Tunicamycin-Einfluss

Die transiente Transformation wurde wie unter 5.3.6.5.2 beschrieben durchgeführt worden. 24 h nach Infiltration der Blätter mit den Agrobakterien wurden 10 ml 10 mM MES-Puffer pH 5,2 mit 10 µl 10 µM Tunicamycinlösung vermischt und in die Blätter infiltriert.

#### 5.3.6.6 Transformation von *Hordeum vulgare*

Unreife Embryonen von *Hordeum vulgare* L. cv. Golden Promise wurden nach der Methode von (Hensel and Kumlehn 2004) transformiert.

### 5.3.7 Methoden zur Reinigung und Isolierung von DNA

#### 5.3.7.1 Plasmidpräparationen

##### 5.3.7.1.1 Miniplasmidpräparation

Die Überprüfung der Bakterienzellen auf das Vorhandensein der jeweiligen transformierten Plasmide erfolgte durch die Miniplasmidpräparationstechnik. Eine Arbeitsanleitung wurde im Anhang unter dem Punkt Miniplasmidpräparation aufgeführt.

##### 5.3.7.1.2 Spinprep

Die Isolierung kleinerer Plasmidmengen wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit nach Herstellerangaben isoliert.

### 5.3.7.1.3 Midiprep

Für die Isolierung größerer Plasmidmengen wurde die Tip100 Säule und das Protokoll von Qiagen verwendet und die Isolierung laut Herstellerangaben vorgenommen.

### 5.3.7.2 Isolierung chromosomaler DNA aus verschiedenen Organismen

#### 5.3.7.2.1 Isolierung chromosomaler DNA aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 und *Klebsiella* sp. ASR1

10 ml LB wurden mit einer frischen Kolonie beimpft und über Nacht ohne Schütteln bei 37 °C inkubiert (Standkultur). Die Kultur wurde 10 min bei 6000 rpm zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde mit 1,5 ml kaltem Resuspendierungspuffer aufgenommen, in ein Eppendorf-Tube überführt und 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 0,7 ml Lysis-Puffer resuspendiert, dann zunächst 10 min auf Eis gestellt und danach 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Suspension wurde viskos. Es wurden 25 µl 30 % Sarkosyl und 4 µl Proteinase K (20 mg/ml) hinzugegeben und die Probe 20 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch auf Eis 2 min gekühlt und vorsichtig gemischt. Nach Zugabe von 700 µl Phenol wurde der Ansatz gemischt und dann für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere (wässrige) Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Gegebenenfalls wurde dieser Schritt 1-2-mal wiederholt, bis die weiße Interphase nach dem Zentrifugieren verschwunden war. Abschließend wurde die wässrige Phase mit 0,7 ml Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) behandelt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand mit 0,5 mg RNase, in TE-Puffer gelöst, bei 37 °C für 15 min inkubiert. Die DNA wurde mit 3 Volumen 96 % Ethanol 10 min auf Eis gefällt, danach 10 min. bei 13000 rpm zentrifugiert und mit 70 %igem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Die chromosomale DNA wurde in 100 µl 1x TE-Puffer bei Raumtemperatur über Nacht gelöst.

#### 5.3.7.2.2 Isolierung chromosomaler DNA aus *Nicotiana tabacum*

Die Isolierung der DNA erfolgte nach dem Protokoll von Ganai (Ganai and Tanksley 1989). Die isolierte DNA wurde in 150 µl TE-Puffer aufgenommen und ÜN bei 4 °C gelöst. Die Analyse der DNA-Menge ist mit der Agarosegelelektrophorese in einem 1 %igen Agarosegel durchgeführt.

#### **5.3.7.2.3 Isolierung chromosomaler DNA aus *Hordeum vulgare***

Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte nach Waite. Dazu wurden 200-400 mg Pflanzenmaterial von jungen Blättern in ein 2 ml Reaktionsgefäß zusammen mit zwei 1,5 mm Stahlkugeln gegeben und in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren. Die Probe wurde in einer vorgekühlten Schwingmühle bei 90 % Intensität 2 min lang homogenisiert. Nach Zugabe von 800 µl Extraktionspuffer wurde die Probe gevortext. Zur Probe wurden nun 800 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gegeben und nochmals ca. 2 min gevortext. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 5000 rpm für 3 min bei RT. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 1/10 Volumen 3 M NaAc pH 5,2 und 1 Volumen Isopropanol zugefügt und das Gemisch geschwenkt. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min bei 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 800 µl 70 % EtOH gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde das erhaltene Pellet bei RT getrocknet. Das Pellet, aufgenommen in 100 µl TE-Puffer mit 40 µg/ml RNase, wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Lagerung bei 4 °C.

#### **5.3.7.3 Aufreinigung aus Agarose**

Zur Extraktion von DNA aus einem Agarosegel wurde der Kit Gelextraktionskit II von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

#### **5.3.7.4 Aufreinigung aus wässrigen Lösungen**

1 Volumen Probe wurde mit 1/10 Volumen Na-Acetat (3 M) pH 5,2 gemischt, mit 3 Volumen EtOH (96 %) versetzt und für 30 min bei –80 °C gefällt. Anschließend wurde die Mischung für 15 min bei 12000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die gefällte DNA wurde nun in Wasser oder geeignetem Puffer zur Weiterverarbeitung aufgenommen.

#### **5.3.7.5 Reinigung mit Phenol-Chloroform**

1 Volumen Probe wurden mit ½ Volumen Phenol gemischt und 5 min auf 60 °C erwärmt. Während des Temperierungsschritts wurde das Gemisch kräftig geschüttelt und anschließend 5 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde zur Reinigung von den Phenolresten 1:1 mit Chloroform versetzt und 5 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Die Oberphase wurde in ein neues Tube überführt.

### **5.3.7.6 Aufreinigung chromosomaler DNA mit LiCl für Southernblot**

30 µg der nach Waite isolierten chromosomalen DNA wurden nach Verdau mit Restriktionsenzymen, 1/10 Volumen 8 M LiCl und 3 Volumen 80 %iges Ethanol zugesetzt und für 1 h bei -20 °C gefällt. Die jeweilige Probe wurde mit 13000 rpm zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes mit 500 µl 80 %igem Ethanol gewaschen und anschließend in einer Speed Vac getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 30 µl TE-Puffer gelöst.

### **5.3.8 Southernblot**

#### **5.3.8.1 Agarose-Gelelektrophorese**

Für die Agarosegelelektrophorese wurden 3 g NEEO-Agarose in 300 ml TBE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlung auf 60 °C in einen Träger gegossen. Auf das 1 %ige Agarosegel wurden je Tasche 30 µg, mit LiCl gereinigte, mit Restriktionsendonukleasen behandelte DNA und zusätzlich zu den DNA-Proben eine 1 kb-Leiter (Fermentas) als DNA-Marker aufgetragen. Als Elektrophoresepuffer diente TBE-Puffer. Das Einlaufen der Proben in das Gel erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V für 30 min und die Trennung für 16 h bei einer Spannung von 25 V.

#### **5.3.8.2 Kapillartransfer**

Nach dem Gellauf wurde der DNA-Marker Bereich abgetrennt und in einer konzentrierten Ethidiumbromidlösung angefärbt, um die verschiedenen Banden zur späteren Größenbestimmung sichtbar zu machen. Die Denaturierung der DNA-Proben erfolgte durch Schwenken des restlichen Gels für 20 min in 0,25 M HCl. Danach wurde 2mal kurz mit dest. H<sub>2</sub>O gespült, um die verbliebene Salzsäure zu entfernen. Nachfolgend wurde das Gel für 20 min in einer 0,4 M NaOH-Lösung inkubiert und anschließend wieder 2mal kurz mit destilliertem H<sub>2</sub>O gespült. Anschließend wurden folgende Arbeitsschritte ausgeführt:

- Über eine Schale, die als Pufferreservoir diente, wurde eine Glasscheibe gelegt.
- Auf die Glasscheibe wurde eine in 0,4 M NaOH getränkte Brücke aus 3 MM Watmanpapier luftblasenfrei aufgezogen und die Enden der Brücke in die mit 0,4 M NaOH gefüllte Schale getaucht.
- Auf die Brücke wurden zwei weitere in 0,4 M NaOH getränkte Lagen 3 MM Watmanpapier in der Größe des Gels gelegt.

- Das Gel wurde dann mit der Taschenöffnung nach unten auf das 3 MM Watmanpapier platziert.
- Anschließend wurden eine trockene Hybond N<sup>+</sup>-Membran von Amersham, gefolgt von 2 weiteren trockenen Lagen 3 MM Watmanpapier sowie eine 10 cm dicke Lage saugfähigen Papiers, auf das Gel luftblasenfrei aufgebracht.
- Der Kapillartransfer der DNA erfolgte für 24 h bei RT.
- Nach dem Abbau des Blots und der Markierung der Position der Taschen wurde die Membran kurz in 20fach SSC geschwenkt und für die weiteren Arbeiten zwischen 3 MM Watmanpapier bei RT trocken gelagert.

### **5.3.8.3 Herstellung einer mit P<sup>32</sup> radioaktiv markierten Sonde**

Zur Herstellung der Sonde wurde ein ca. 700 b großes Teilstück des Hygromycin Resistenzgens mittels PCR mit den Primern Hyg1 und Hyg2 amplifiziert. (Hensel and Kumlehn 2004) Zur Markierung der DNA wurde der Highprime-Kit von Roche eingesetzt. Die Reinigung der Sonde von ungebundenem P<sup>32</sup> wurde mit Hilfe von Entsalzungssäulen (Amersham) vorgenommen und die Sonde kurz vor ihrer Weiterverwendung bei 95 °C für 5 min denaturiert.

### **5.3.8.4 Prähybridisierung und Hybridisierung**

Zur Prähybridisierung wurde die trocken gelagerte Hybond N<sup>+</sup>-Membran kurz in destilliertem H<sub>2</sub>O geschwenkt, anschließend mit der DNA-Seite nach innen gerollt und in ein Hybridisierungsröhrchen überführt. Zu der luftblasenfrei an der Röhrchenwand anliegenden Membran wurden 50 ml des auf 65 °C vorgewärmten Churchpuffers mit Heringssperma gegeben und dann im Rollofen für 1 h bei 65 °C prähybridisiert. Der Prähybridisierungspuffer wurde verworfen. Zur jeweiligen Sonde wurden 30 ml des auf 65 °C vorgewärmten Churchpuffers hinzu gegeben. Die Hybridisierungsreaktion lief bei 65 °C für 24 h ab.

### **5.3.8.5 Waschen und Entwicklung des Southernblots**

Der erste Waschschrift erfolgte für 10-15 min mit 6mal SSC. Danach wurde die Radioaktivität mit einem Geigerzähler gemessen. Ab einer Restaktivität von ca. 10 Becquerels wurde die Membran in eine Folie eingeschweißt, in eine Filmkassette gelegt und in der Dunkelkammer ein Film (Kodak) darüber gelegt. Dieser wurde in der Kassette für 1-2 Tage

bzw. bis zu einer Woche bei -80 °C exponiert. Die Entwicklung erfolgte nach Anleitung des Filmherstellers.

## **5.4 Proteinarbeiten**

Alle Proteinarbeiten wurden, wenn nicht anders beschrieben, bei 4 °C durchgeführt.

### **5.4.1 Proteinisolierung**

#### **5.4.1.1 Extraktion von Proteinen aus pflanzlichem Material**

##### **5.4.1.1.1 Isolierung von Proteinen aus Blattmaterial von *Nicotiana tabacum* und *Hordeum vulgare***

Frisches Blattmaterial der T<sub>2</sub>-Generation wurde mit flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Zusammen mit flüssigem Stickstoff wurde das Blattmaterial in einem Mörser homogenisiert und mit einem 50 mM Na-Acetatpuffer pH 5 extrahiert. Nach der Zentrifugation bei 4 °C und 6000 rpm wurde die lösliche Fraktion zur weiteren Aufreinigung oder Phytaseaktivitätstests verwendet.

##### **5.4.1.1.2 Isolierung extrazellulärer Flüssigkeit aus *Nicotiana tabacum***

Die Isolierung extrazellulärer Flüssigkeit aus Tabakblättern wurde nach der Methode von (Verwoerd, van Paridon et al. 1995) ausgeführt. Die Vakuum-Infiltration erfolgte mit 50 mM Tris-HCl pH 6,8 mit 2 mM CaCl<sub>2</sub> für die Tabakpflanzen mit integrierter *Bacillus* Phytase und mit 50 mM Na-Acetat-Puffer pH 5,0 für die Tabakpflanzen mit *Klebsiella* Phytase. Die gewonnene extrazelluläre Flüssigkeit wurde für weitere Untersuchungen wie Phytaseaktivitätstest, Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976), SDS-PAGE und Westernblot eingesetzt.

##### **5.4.1.1.3 Sekretionsversuche mit *Nicotiana tabacum* und *Hordeum vulgare***

Für die Sekretion der rekombinanten Proteine wurden intakte junge Tabakpflanzen auf MS-Agar angezogen und nach 4 Wochen aus dem Medium entfernt, vorsichtig mit destilliertem Wasser gespült und in Falcontubes mit 25 ml belüfteter MS-Nährlösung umgesetzt. Der Verbrauch an Nährlösung durch die Pflanze wurde jeden Tag wieder auf 25 ml ergänzt.

Für die Sekretion der rekombinanten Proteine durch Gerste wurden Samen auf feuchtem Filterpapier ausgekeimt und in Nährlösung umgesetzt und belüftet. Mit Eintreten des Dreiblattstadiums konnten die Pflanzen in 50 ml-Falcontubes mit 25 ml Nährlösung umgesetzt und weiter belüftet werden. Der Verbrauch der Nährlösung durch die Pflanze wurde täglich wieder auf 25 ml ergänzt.

### **5.4.2 Proteinfällung**

#### **5.4.2.1 Ethanolfällung**

Zur jeweiligen Probe wurden unter Rühren 3 Volumen eiskaltes 96 % EtOH tropfenweise zugegeben und das Gemisch über Nacht stehen gelassen. Der entstandene Niederschlag wurde mit 3000 rpm für 15 min sedimentiert und das erhaltene Pellet einmal mit Aceton gewaschen. Eine weitere Zentrifugation erfolgte unter o.a. Bedingungen. Das Pellet, bei Raumtemperatur getrocknet, wurde in eiskaltem 20 mM Na-Acetat-Puffer pH 5,2 aufgenommen. Unlösliche Bestandteile wurden bei 4 °C, 15000 rpm für 30 min sedimentiert.

#### **5.4.2.2 Ammoniumsulfatfällung**

Zur jeweiligen Probe wurde gemörsertes  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in kleinen Portionen bis zu einer Endkonzentration von 30 % Sättigung gegeben und die Probe über Nacht unter Rühren inkubiert. Anschließend wurde der entstandene Niederschlag mit 15000 rpm für 20 min sedimentiert und verworfen. Der Überstand, erneut mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  bis zu einer Sättigung von 70 % versetzt, wurde nach Inkubation über Nacht unter Rühren mit 15000 rpm für 20 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 mM Na-Acetatpuffer pH 5,2 gelöst und unlösliche Bestandteile mittels Zentrifugation mit 15000 rpm, 20 min entfernt.

#### **5.4.2.3 Fällung mit Trichloressigsäure**

Zu 1 ml Probe wurden 60 µl 20 %ige Trichloressigsäure und 25 µl 2 %ige Natriumdesoxycholatlösung zugegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 15 min bei 4 °C mit 14000 rpm pelletiert und der Überstand verworfen. Nach Waschen mit 1 ml Aceton wurde nachfolgend mit 14000 rpm bei 4 °C für 10 min erneut pelletiert. Das präzipitierte und getrocknete Protein wurde in 20 µl Probenpuffer für die Elektrophorese aufgenommen.



### 5.4.3 Umpufferung von Proteinproben

#### 5.4.3.1 Dialyse

Zur Entsalzung bzw. zur Umpufferung von Proteinproben mit größeren Volumina wurde die Dialyse verwendet. Dazu wurde ein Dialyseschlauch, aus einer Membran mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa, für 10 min in destilliertem Wasser gekocht. 1 Volumen der Probe wurde gegen 1000 Volumen Puffersubstanz für 12 h unter leichtem Rühren bei 4° C dialysiert.

#### 5.4.3.2 PD10-Säulen (GE Healthcare)

Zur Entsalzung bzw. Umpufferung von Probenvolumina bis 2,5 ml wurden PD10-Säulen von GE Healthcare nach Herstellerangaben eingesetzt. Dabei wurden Salze und Proteine durch Gelfiltration über eine Sephadex G25-Säule aufgrund ihrer Größe getrennt.

### 5.4.4 Säulenchromatographie mit Hilfe des LCC500-FPLC-Systems (Pharmacia)

#### 5.4.4.1 Ionenaustauschchromatographie

##### 5.4.4.1.1 SP-Sepharose

Für die Aufreinigung der Phytase PhyC aus *Bacillus amyloliquefaciens* aus verschiedenen Organismen wurde als starker Kationenaustauscher die SP-Sepharose High Performance 16/100-Säule (GE Healthcare) verwendet. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Ein UV-Detektor dokumentierte bei 280 nm den Säulenlauf. Die Equilibrierung der Säule erfolgte mit ca. 2 Säulenvolumen 20 mM Na-Acetat-Puffer pH 5,2. Nach Auftragung der dialysierten Proteinlösung erfolgten mehrere Waschschrte mit jeweils einem Säulenvolumen. Dem 1. Waschschrte mit 20 mM Na-Acetat-Puffer pH 5,2, folgte der Waschschrte 2 mit einer Lösung von 20 mM Na-Acetat-Puffer pH 5,2 und 50 mM NaCl, der 3. Waschschrte wurde schließlich mit 20 mM Na-Acetat-Puffer pH 5,2 mit 100 mM NaCl durchgeführt. Die Elution verlief mit einem linearen Gradienten von 150-500 mM NaCl in 20 mM Na-Acetat-Puffer pH 5,2 über 100 min. Das Eluat wurde in 1 ml Fraktionen aufgefangen. Fraktionen, die Phytaseaktivität enthielten, wurden gepoolt und für die weitere Reinigung auf Eis gelagert.

#### 5.4.4.1.2 CM-Sepharose

Für die Aufreinigung der Phytase PhyK von *Klebsiella* sp. ASR1 aus verschiedenen Organismen wurde als schwacher Kationenaustauscher die CM-Sepharose High Performance 16/100-Säule (GE-Healthcare) mit 25 ml Säulenmaterial eingesetzt. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Mittels UV-Detektor wurde der Säulenlauf bei 280 nm dokumentiert. Die Equilibrierung der Säule erfolgte mit drei Säulenvolumen 50 mM Na-Acetat-Puffer pH 5,0 (4 °C). Nach Auftragung der dialysierten Proteinlösung schlossen sich mehrere Waschschrirte mit jeweils 3 Säulenvolumen an. Der 1. Waschschrirte erfolgte mit 50 mM Na-Acetat-Puffer pH 5,0, Waschschrirte 2 fand mit einer Lösung von 50 mM Na-Acetat-Puffer pH 5,0 und 50 mM NaCl statt. Die Elution erfolgte mit 250 mM NaCl in 50 mM Na-Acetat-Puffer pH 5,0 über 50 min. Das Eluat wurde in 1 ml Fraktionen aufgefangen. Fraktionen, die Phytaseaktivität enthielten, wurden gepoolt und für die weitere Reinigung auf Eis gelagert.

#### 5.4.4.2 Gelfiltration

##### 5.4.4.2.1 Präparative Gelfiltration mit Superdex 75 (Pharmacia)

Als zweiten chromatographischen Schritte bei der Aufreinigung von PhyC aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 und *Nicotiana tabacum* wurde eine Superdex 75 Prepgrade High Load 16/60 (Pharmacia) Gelfiltrationsäule verwendet. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min. Die Equilibrierung der Säule erfolgte mit einer Lösung aus 25 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,0 mit 300 mM NaCl. Die Proteinlösungen wurden durch Ultrafiltration mittels Amicon Ultra 15 30 k mit 25 mM Tris-HCl-Puffer mit 300 mM NaCl umgepuffert und eingeeengt.

500 µl der eingeeengten Proteinlösung wurden mit Hilfe eines Superloops auf die Säule geladen. Die Dokumentierung des Säulenlaufs erfolgte mit Hilfe eines UV-Detektors bei 280 nm. Die in 0,5 ml Fraktionen gesammelt Proben wurden mit dem Standard-Phytaseaktivitätstest untersucht und solche mit Phytaseaktivität durch eine SDS-PAGE optisch auf ihre Reinheit überprüft. Die Fraktionen mit der höchsten Reinheit wurden gepoolt und für die biochemische Charakterisierung weiterverwendet.

### 5.4.4.3 Affinitätschromatographie

#### 5.4.4.3.1 Reinigung polyklonaler Antikörper mittels Hi-Trap Protein G-HP-Säule (GE-Healthcare)

Für die Herstellung einer Affinitätschromatographiesäule zur Reinigung von PhyC und PhyK wurde eine Reinigung und Konzentrierung der IgG-Fraktion der Antikörperseren gegen PhyC und PhyK aus Kaninchen erforderlich.

Hierzu wurde eine 1 ml Hi-Trap Protein G-HP-Säule von (GE Healthcare) eingesetzt.

Protein G besteht aus bakteriellen Proteinen der Gruppe G Streptokokken. Die Proteine werden in Säulenform von GE-Healthcare als rekombinante Form mit Deletion der Albumin-bindenden Region an Sepharose gekoppelt angeboten.

Für die Aufreinigung von 1 ml Antikörperserum wurde dieses mit 15 ml 20 mM Na-Phosphatpuffer pH 7 versetzt und durch einen 0,45 µm Filter filtriert und das Gemisch dann mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule aufgetragen. Mit Hilfe eines UV-Detektors bei 280 nm wurde der Säulenlauf dokumentiert. Nach einem 30 ml Waschschriff mit 20 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,0 wurde die Elution mit 10 ml 0,1 M Glycin/HCl-Puffer pH 2.7 durchgeführt. Nach Auswertung des Chromatogramms wurden die 0,5 ml Fraktionen für den Westernblot ausgewählt, die innerhalb des Elutionspeaks lagen. Die Fraktionen, die im Westernblot ein positives Ergebnis erbrachten, wurden gepoolt und für die Beladung der 5 ml HiTrap™ NHS-aktivierte HP Säulen verwendet.

#### 5.4.4.3.2 Hitrap™ NHS-aktivierte HP Säulen

An eine 5 ml Hitrap™ NHS-aktivierte HP Säule (GE-Healthcare) wurden aus Serum gereinigte polyklonale Antikörper gegen die Phytase aus *Klebsiella* sp. ASR1 bzw. *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 nach Herstellerangaben gebunden.

Zur Aufreinigung der jeweiligen Phytase musste die Proteinlösung in den Bindepuffer mit Hilfe einer Amiconzelle umgepuffert und auf 5 ml eingeeengt werden. Die Säule wurde mit 3 Säulenvolumen Bindepuffer mit einer Flussrate von 1 ml/min äquibriert. Die Auftragung der Probe erfolgte mit Hilfe einer Spritze mit 0,5 ml/min. Zur Bindung wurde die Säule bei RT für 1 h inkubiert und anschließend mit einer Flussrate von 1 ml/min mit 2 Säulenvolumen des Bindepuffers gewaschen. Die Elution wurde mit 2 Säulenvolumen des Elutionspuffers bei einer Flussrate von 1 ml/min und einer Fraktionsgröße von 0,5 ml

durchgeführt. Die Fraktionen wurden sofort mit 10 µl 3 M Tris-HCl pH 8,8 neutralisiert. Die notwendigen Lösungen wurden in Tabelle 50 aufgeführt.

**Tabelle 50:** Lösungen für die Affinitätschromatographie mittels NHS-Säule.

LÖSUNG	ZUSAMMENSETZUNG
Bindepuffer	50 mM TrisHCl pH 7,5 250 mM NaCl 10% Glycerin
Elutionspuffer	0,1 M Glycin HCl pH 2,7

## 5.4.5 Proteinelektrophorese

### 5.4.5.1 Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen im Polyacrylamidgel unter diskontinuierlichen Bedingungen wurde die Methode nach Laemmli übernommen (Laemmli 1970). Der Lauf der Minigele fand in einer Miniprotean 3 Anlage von Biorad Laboratories Inc. statt. Der Einlauf der Proteine in das Polyacrylamid erfolgte für 30 min bei RT mit 80 V. Anschließend fand die Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 150 V statt. Die zur Durchführung der SDS-Gelelektrophorese notwendigen Lösungen wurden in den Tabellen 50 und 51 zusammengestellt.

**Tabelle 51:** Puffer für die SDS-PAGE

LÖSUNG	ZUSAMMENSETZUNG
5 x SDS-Ladepuffer	0,125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 20 % Glycerin, 4 % SDS, 1,4 M β-Mercaptoethanol, 1 Vol% Bromphenolblau
10 x Tris-Glycin-Laufpuffer	250 mM Tris, 1,92 M Glycin pH 8,8
1 x SDS-Elektrophorese-Laufpuffer	1 x Tris-Glycin-Laufpuffer mit 1 % SDS

**Tabelle 52:** Lösungen für die Herstellung eines SDS-Gels.

LÖSUNG	TRENNGEL	SAMMELGEL
	12 %	4 %
40 % Acryl-Bisacrylamid-Lsg.(29:1)	3,6 ml	0,5 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8.8	3,28 ml	-
0,5 M Tris-HCl pH 6.8	-	1,25 ml
Aqua dest.	4,92 ml	3,2 ml

10 % SDS	0,13 ml	50 µl
10 % APS	66 µl	25 µl
TEMED	6 µl	5 µl

### 5.4.5.2 Nachweis von Proteinen im Polyacrylamidgel

#### 5.4.5.2.1 Coomassiefärbung

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurde das Gel für 15 min zwecks Fixierung in 50 ml Fixierlösung auf einem Wippschüttler bewegt und anschließend für 1 h in die Coomassie Brillant Blau R-250 und G-250 enthaltende Färbelösung gegeben und weitergeschüttelt. Das Gel wurde danach kurz in destilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen und schließlich in der Entfärbelösung solange geschüttelt bis die blau gefärbten Proteinbanden sichtbar und der Hintergrund vollständig entfärbt war.

**Tabelle 53:** Lösungen für Coomassiefärbung.

LÖSUNG	ZUSAMMENSETZUNG
Fixierlösung	14,3 % Ethanol (96 %) 14,3 % Eisessig 71,4 % dest. H <sub>2</sub> O
Coomassie-Färbelösung	Coomassie Brillant Blau R-250 Coomassie Brillant Blau G-250 Methanol dest. H <sub>2</sub> O
Entfärbelösung	14,3 % Ethanol (96 %) 14,3 % Eisessig 71,4 % dest. H <sub>2</sub> O

#### 5.4.5.3 Silberfärbung

Zur Färbung eines Minigels mit Silber wurde das Gel nach dem Lauf zweimal für 5 min in je 50 ml 10 %igem Ethanol geschüttelt und anschließend für 10 min in 0,7%iger Periodsäure unter Schütteln inkubiert. Danach wurde das Gel dreimal für 3 min mit destilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen und darauf für 1 min in 100 ml 0,02%iger Natriumthiosulfatlösung geschwenkt. Das überschüssige Natriumthiosulfat wurde durch Waschen mit destilliertem H<sub>2</sub>O für dreimal 20 s entfernt. Nun wurde das Gel mit 0,1%iger Silbernitratlösung versetzt und für 30 min bei RT auf einem Wippschüttler geschwenkt,

nach 30 min die Silbernitratlösung entfernt und das Gel für 20 s in destilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen. Das Sichtbarmachen der Proteinbanden erfolgte durch Schwenken des Gels in 100 ml Entwicklerlösung. Die Reaktion wurde mit einer 0,05 M EDTA-Lösung für 10 min gestoppt.

**Tabelle 54:** Lösungen für Silberfärbung.

LÖSUNG	ZUSAMMENSETZUNG
10 % Ethanol	10 % Ethanol reinst 90 % dest. H <sub>2</sub> O
0,7 % Periodsäure	0,7 g Periodsäure ad 100 ml dest. H <sub>2</sub> O
0,02 % Natriumthiosulfat	50 mg Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ad 250 ml dest. H <sub>2</sub> O
0,1 % Silbernitrat	0,1 g AgNO <sub>3</sub> 23 µl 37 % Formaldehyd ad 100 ml dest. H <sub>2</sub> O
Entwickler	6 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2 ml 0,02 % Natriumthiosulfatlösung 57 µl 37 % Formaldehyd ad 100 ml dest. H <sub>2</sub> O
0,05 M EDTA (Natriumsalz)	1,86 g C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> x 2H <sub>2</sub> O ad 100 ml dest. H <sub>2</sub> O

#### 5.4.5.4 Färbung von Glykoproteinen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden diese im SDS-Polyacrylamidgel für 15 min durch Schwenken in der Fixierlösung, bestehend aus 10 % Essigsäure, 50 % Ethanol und 40 % dest. H<sub>2</sub>O, fixiert. Durch 10minütiges Waschen mit 10%igem Ethanol wurde überschüssiger Fixierer entfernt, gefolgt von einem weiteren 10minütigen Waschschriff mit 7%iger Essigsäure.

Die Oxidation der Zuckerringe mit Bildung von Aldehydgruppen wurde durch eine Inkubation des Proteingels für 60 min in 0,7%iger Periodsäure erreicht. Die überschüssige Periodsäure ließ sich durch 3maliges Behandeln für 10 min mit 7%iger Essigsäure entfernen. Nach zwei weiteren Waschschriffen mit destilliertem H<sub>2</sub>O wurde das Gel mit Schiffs-Reagenz solange überschichtet, bis sich eine rötliche Anfärbung der glykosylierten Proteine zeigte. Die Entfärbung des Gels erfolgte durch dreimaliges Waschen in einer 0,1%igen Natriummetabisulfitlösung in 0,01 M HCl.

### 5.4.5.5 Westernblot-Analyse

Grundlage für die Westernblot-Analyse war eine diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese nach der unter 5.4.5.1 beschriebenen Methode. Das erhaltene SDS-Polyacrylamidgel wurde anschließend für 15 min in 50 ml Transferpuffer unter Schütteln bei RT gewaschen. Für den Transfer der Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran (Porablot NCL 0,45 µm Macherey Nagel) wurde die Semi-Dry-Blotapparatur von Biorad nach Herstellerangaben benutzt. Der Transfer erfolgte für 15 min bei 15 V. Im Anschluss wurde die Nitrocellulosemembran kurz in 1 x TBST-Puffer gewaschen und dann für 30 min mit einer Block-Lösung bei RT behandelt.

Der erste Antikörper wurde in Antikörper-Lösung 1:1000 eingesetzt und die Membran für 2 h bei RT oder ÜN bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Danach schlossen sich vier Waschschritte der Membran mit einfach konzentriertem TBST-Puffer für 5 min an.

Die Inkubation der Membran mit dem zweiten, an eine alkalische Phosphatase gekoppelten Antikörper (Sigma-Aldrich), erfolgte in einer Antikörperverdünnung 1:10000 für 30 min unter Schütteln bei RT in 1 x TBST-Puffer. Zur Entfernung des unspezifisch gebundenen Antikörpers wurde die Membran 4mal für 5 min mit 1 x TBST-Puffer gewaschen.

Die Entwicklung des Blots erfolgte mit Nitrobluetetrazolium (NBT) und 5-Bromo-3-chloro-5-indolyl-phosphat (BCIP) als Substrat für die, an den Antikörper gekoppelte, alkalische Phosphatase. Dazu wurde die Membran für 2 min im AP-Puffer vorinkubiert und in den AP-Puffer wurden NBT und BCIP gegeben. Nach Abspaltung des Phosphatrests durch die alkalische Phosphatase wurde dieses mit NBT zu einem blauen Farbstoff komplexiert und damit das zu detektierende Protein als Bande auf der Membran sichtbar gemacht.

**Tabelle 55:** Lösungen für Westernblot.

BEZEICHNUNG	ZUSAMMENSETZUNG
10 x TBST-Puffer	100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1,5 M NaCl, 1 % Tween20
Antikörperlösung	1 x TBST mit 4 % Magermilchpulver und spezif. Antikörper (1:1000-1:10000)
AP-Puffer	100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub>

Block-Lösung	1 x TBST mit 5 % Magermilchpulver
Transfer-Puffer	1 x Tris-Glycin-Laufpuffer mit 20 % Methanol
NBT	50 mg Nitrobluetetrazoliumad in 1 ml 100% Dimethylsulfoxid
BCIP	50 mg Bromo-chloro-indolyl-phosphat in 1 ml 100% Dimethylsulfoxid

#### 5.4.6 Biochemische Charakterisierung

##### 5.4.6.1 Phytaseaktivitätstest

Das Testprinzip beruht auf der Freisetzung des *ortho*-Phosphats aus dem Substrat *myo*-Inositolhexakisphosphat durch das Enzym Phytase. Die Reaktion wird durch Zugabe von saurer Molybdat-Vanadat-Lösung gestoppt, wobei mit dem von der Phytase freigesetzten Phosphat ein gefärbter Komplex entsteht. Die Farbintensität dieses gelben Komplexes ist ein Maß für die Menge an freigesetztem Phosphat und kann bei 414 nm photometrisch bestimmt werden.

Für den Test wurden 25 µl der jeweiligen Probe mit 125 µl des Phytasesubstrats Na-Phytat (Natriumphytat-Dodecasalz; Sigma Aldrich) gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert, anschließend die Reaktion mit 150 µl Molybdat-Vanadat-Lösung gestoppt und deren Extinktion bei 414 nm bestimmt. Für jede Probe wurde ein Nullwert ermittelt, der den Gehalt an *ortho*-Phosphat in der Probe und der Substratlösung ohne Ablauf der enzymatischen Reaktion erfasste. Zur Bestimmung der *ortho*-Phosphatkonzentration in der Probe diente eine Eichgerade, die durch Messung der Extinktion von 150 µl Phosphatlösung einer bestimmten Phosphatkonzentration zwischen 0-5 mM und 150 µl Molybdat-Vanadat-Lösung ermittelt wurde.

Aus der Eichgerade errechnet sich der molare Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$  nach dem Lambert-Beerschen Gesetz wie folgt:

$$E = \varepsilon * c * d \quad (3)$$

Der Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$  ergibt sich nach linearer Regression zu 0,1202mmol/cm<sup>3</sup>. Aus den photometrischen Werten der Reaktionsansätze lässt sich die Phytase-Aktivität folgendermaßen berechnen:



$$\frac{(E_{\text{Probe}} - E_{\text{Nullwert}}) * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Ansatzvolumen (Probe + Substrat)} [ml]}{\varepsilon [mmol/cm^3] * \text{Inkubationszeit} [min] * \text{Probenvolumen} [ml]} \quad (4)$$

Die Aktivität (U) wurde als  $\mu\text{mol}$  freigesetztes Phosphat pro Minute definiert. Unter Einbeziehung der im Test verwendeten Volumina, wurde die Volumenaktivität (U/ml) und nach Bezug auf die Proteinkonzentration der Enzyme, die spezifische Aktivität (U/mg) berechnet.

**Tabelle 56:** Substratlösungen für den Standard-Phytaseaktivitätstest.

ENZYM	SUBSTRATLÖSUNG
PhyC	100 mM TrisHCl pH 7,0 5 mM Na-Phytat Dodecasalz (Sigma-Aldrich) 2,5 mM $\text{CaCl}_2$
PhyK	100 mM NaAcetat pH 5,0 5 mM Na-Phytat Dodecasalz (Sigma-Aldrich)

#### 5.4.6.2 Probenaufbereitung für den Phytaseaktivitätstest aus Blattmaterial

Aus dem Blatt von *Nicotiana tabacum* bzw. *Hordeum vulgare* Pflanzen wurden pro Eppendorf-Reaktionsgefäß 2 Scheiben Blattmaterial mit einem Korkbohrer (4 mm Durchmesser) ausgestochen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden in einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser homogenisiert, in 250  $\mu\text{l}$  50 mM Na-Acetatpuffer pH 5 aufgenommen, durch vortexen resuspendiert und bei 4 °C und 14000 rpm für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Messung der Phytaseaktivitäten, wie unter 5.4.6.1 beschrieben, verwendet.

#### 5.4.6.3 Probenaufbereitung für den Phytaseaktivitätstest aus Samenmehl

Die Samen wurden vor der Homogenisation bei 65 °C für mindestens 48 h getrocknet und anschließend in einer Kugelmühle gemahlen. 50 mg des Samenmehls wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß eingewogen und mit 1 ml eiskaltem 100 mM Na-Acetatpuffer, pH 5, für transgene Linien mit PhyK und 100 mM TrisHCl mit 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7, für die Linien mit PhyC versetzt. Die Proben wurden für 10 min auf Eis inkubiert und während der Inkubation 3mal für 15 s gevortext. Nach der Zentrifugation bei 4 °C für 15 min wurde

der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für die Bestimmung der Phytaseaktivitäten, wie unter 5.4.6.1 beschrieben, genutzt.

#### 5.4.6.4 Temperaturoptimum und Temperaturstabilität

Die Bestimmung der Temperaturoptima der Phytasen erfolgte wie im Assay unter 5.4.6.1 beschrieben. Die Temperaturen im Test lagen für PhyC zwischen 30 °C und 85 °C und für PhyK zwischen 37 und 60 °C. Das Substrat wurde bei den verschiedenen Temperaturen vorinkubiert und der pH gegebenenfalls nachgestellt. Danach wurden die Enzymproben hinzupipettiert und nach Ablauf der Inkubationszeit die Enzymreaktion abgestoppt.

Für die Bestimmung der Temperaturstabilität von PhyC wurden die Enzymproben ohne Substrat bei Temperaturen zwischen 25 °C und 80 °C für 20 min vorinkubiert. Nach Abkühlen der Enzymproben erfolgte die Bestimmung der Restaktivitäten mittels Phytasetests nach 5.4.6.1. Für PhyK erfolgte die Messung nach nur 10minütiger Vorinkubation zwischen 0 °C und 70 °C.

#### 5.4.6.5 pH-Optimum und pH-Stabilität

Die Bestimmung der pH-Optima der Phytasen erfolgte wie unter 5.4.6.1 beschrieben. Na-Phytat wurde zu einer Endkonzentration von 5 mM in den folgenden 200 mM Puffern gelöst und der pH bei 37 °C genau eingestellt. Für PhyC wurde zusätzlich  $\text{CaCl}_2$  bis zu einer Endkonzentration von 2,5 mM hinzugesetzt.

**Tabelle 57:** Substratlösungen für die Messung der pH-Spektren.

pH-BEREICH	PUFFER (200 mM)
1,0 - 3,5	Glycin-HCl
3,5 - 5,5	Na-Acetat
5,5 - 7,0	Bis-Tris-HCl
7,0 - 8,5	Tris-HCl
8,5 - 10,0	Glycin-NaOH

#### 5.4.6.6 Kinetische Parameter

Die Bestimmungen der  $K_m$ -,  $k_{cat}$ - und  $V_{max}$ -Werte erfolgte auf Grundlage des Phytaseaktivitätstests. Die Substratkonzentrationen wurden zwischen 0,25 mM und 2 mM für PhyC und zwischen 0,1-0,6 mM für PhyK gewählt. Die optimale Enzymmenge und die

geeigneten Zeitpunkte für die Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeiten wurden zuvor ermittelt.

Die grafisch bestimmten Reaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der jeweiligen Substratkonzentrationen wurden im Michaelis-Menten-, Lineweaver-Burk- und Hanes-Diagramm aufgetragen und dabei möglichst alle drei Auftragungen für die Bestimmung der  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Wertes berücksichtigt.

#### **5.4.6.7 Proteinbestimmung nach Bradford**

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford (Bradford 1976) bestimmt.

Der Nachweis beruht auf der Beobachtung von Bradford, nach der das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung von Coomassie Brilliant Blau nach Ausbildung von Proteinkomplexen von 465 nm nach 595 nm verschoben wird.

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Lösung Roti<sup>®</sup>-Quant (Carl Roth GmbH) nach Herstellerangaben herangezogen.

#### **5.4.7 Bodenanalyse**

##### **5.4.7.1 Herstellung des Bodens (Zusammensetzung)**

Der Boden für den Wachstumsversuch bei pH 5,3 bestand zu 89 % aus Quarzsand, 10 % aus Löss und 1 % Torf. Für den Wachstumsversuch bei einem pH-Wert von 7,3 setzte er sich aus 89,68 % aus Quarzsand, 10 % aus Löss und 0,32 % aus Perlite zusammen. Der Boden wurde vor Mischung und Verwendung bei 40 °C für 72 h getrocknet, durch ein 2 mm Sieb gestrichen und 650 g in zylindrische Töpfe mit einer Höhe von 18 cm und einem Durchmesser von 5 cm gefüllt.

##### **5.4.7.2 pH-Wert Bestimmung**

Die elektrometrische Bestimmung der  $H^+$ -Ionen-Aktivität im Boden, ausgedrückt als deren negativer dekadischer Logarithmus, ist in einer neutralen Salzlösung aus 0,01 M  $CaCl_2$  erfolgt. Dazu sind 10 g des luftgetrockneten Mineralbodens mit 25 ml einer 0,01 M  $CaCl_2$ -Lösung versetzt und resuspendiert worden. Die Suspension ist innerhalb 1 h zweimal er-

neut mit einem Glasstab durchmischt und anschließend mit einem vorher geeichten pH-Meter gemessen worden.

### **5.4.7.3 Bestimmung des pflanzenverfügbaren P-Gehalts des Bodens mit der CAL-Methode**

Zur Bestimmung des pflanzenverfügbaren P-Gehaltes des Bodens wurden 5 g des luftgetrockneten auf 2 mm gesiebten Mineralbodens in eine Schüttelflasche eingewogen und mit 100 ml der CAL-Gebrauchslösung versetzt. Die Bodensuspension wurde für 90 min mit 250 rpm auf einem Bodenschüttler bei RT inkubiert und durch einen phosphorarmen Filter gegeben. 10 ml des Filtrats wurden mit 15 ml dest. H<sub>2</sub>O versetzt und mit 1 ml einer 5%igen (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> x 4H<sub>2</sub>O gemischt. Die Reduktionsreaktion erfolgte durch Zugabe von 1 ml einer Reduktionslösung aus Ascorbinsäure und Zinnchlorid. Die Messung des blauen Farbkomplexes erfolgte bei einer Wellenlänge von  $\lambda=588$  nm.

### **5.4.7.4 Bestimmung der Wasserhaltekapazität des Bodens**

Zur Bestimmung der Wasserhaltekapazität der Böden wurden jeweils 100 g des getrockneten Bodens in Gefäße mit Löchern in der Unterseite gefüllt, mit Wasser gesättigt und zum Abtropfen für 24 h bei RT gelagert. Anschließend wurde die Differenz zum Ausgangsgewicht ermittelt.

## **5.4.8 Pflanzenanalyse**

### **5.4.8.1 Statistik**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit PASW-Statistics 18 (früher SPSS18 Windows). Zur Prüfung statistischer Unterschiede zweier Mittelwerte wurde der T-Test herangezogen. Die Daten wurden zuvor bezüglich der Gleichheit ihrer Varianz mit dem Levene-Test geprüft. Statistisch signifikante Befunde wurden, mit der Sternsymbolik ( $p < 0,05$ ;) gekennzeichnet, direkt in die Abbildungen eingetragen.

### **5.4.8.2 Frischmasse**

Zur Bestimmung der Frischmasse des Sprosses wurde dieser direkt über dem Boden abgetrennt und sofort gewogen und die der Wurzel nach gründlichem Waschen mit destilliertem Wasser sowie anschließender Trocknung mit saugfähigem Papier ermittelt.

### 5.4.8.3 Trockenmasse

Zur Bestimmung der Trockenmasse wurden die Spross- und Wurzelproben bei 65 °C für mindestens 48 h getrocknet und sofort nach der Entnahme aus dem Trockenschrank gewogen.

### 5.4.8.4 Bestimmung des Gesamt-P-Gehalts im Sproß

Das bei 65 °C getrocknete Blattmaterial oder Samenmaterial wurde in einer elektrischen Kaffeemühle gemahlen und darauf in einer Kugelmühle homogenisiert. 500 mg des fein gemahlenden Materials wurden in einem Borosilikatglasgefäß in einem Muffelofen bei 500 °C ÜN verascht. Die Proben wurden nach Abkühlung mit einigen Tropfen destilliertem Wasser angefeuchtet und anschließend mit einigen Tropfen 1:3 verdünnter HNO<sub>3</sub> versetzt. Die so behandelten Proben wurden auf einer Heizplatte vollständig getrocknet und danach für 1 h erneut bei 500 °C nachverascht. Der Veraschrungsrückstand wurde in 5 ml 1:3 verdünnter HNO<sub>3</sub> gelöst, die Aschelösung schließlich auf einer Heizplatte bei ca. 100 °C eingedampft, erneut in 5 ml 1:3 verdünnter HCl gelöst und anschließend eingedampft. Zum Abschluss wurde in 5 ml HCl gelöst, in einen 50 ml Meßkolben überführt und mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Nach Filtration der Aschelösung durch einen P-armen Filter wurden 5 ml des Filtrats mit 7,5 ml des Ammoniummolybdat-Vanadat-Reagenz versetzt und zu 25 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Der mit *ortho*-Phosphat und Ammoniummolybdat-Vanadatlösung entstehende gelbe Farbkomplex wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda=436$  nm gemessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand einer Standardreihe von 0,1 bis 12,5 mg P/50 ml.

### 5.4.8.5 Bestimmung des Gesamt-P-Gehalts in Samen

Zur Bestimmung des totalen Phosphorgehalts wurden die Samen mit einer Kugelmühle homogenisiert und das Mehl anschließend bei 65 °C für 48 h getrocknet. Zur Bestimmung wurden 250 mg des Probenmaterials eingesetzt. Der Aufschluss und die Bestimmung erfolgten nach der unter 5.4.8.4 beschriebenen Methode.

### 5.4.8.6 Bestimmung des Phytatgehalts in Samen durch HPIC-Analyse

#### 5.4.8.6.1 Extraktion der Inositolphosphate aus Samen

Der Samen wurde zur Bestimmung des Inositolphosphatgehaltes mit einer Kugelmühle homogenisiert und das Mehl anschließend bei 65 °C für 48 h getrocknet. 50 mg des Sa-

menmehls wurden mit 1 ml 0,4 M HCl versetzt und gründlich durch vortexen resuspendiert. Die Probe wurden über Nacht bei Raumtemperatur mit 200 rpm geschüttelt und anschließend die unlöslichen Bestandteile durch 30minütige Zentrifugation in einer Tischzentrifuge mit 13000 rpm abgetrennt. Der Überstand wurde für die HPIC-Analyse verwendet.

### **5.4.8.6.2 HPIC-Analyse**

Je 0,5ml jeder Probe sowie der Nullprobe wurde nach Zentrifugation des Überstandes in HPLC-Probenfläschen (Agilent) überführt und die Bestimmung mittels HPLC (Chromatography Compartment AS50 Dionex) bei 25 °C durchgeführt. Die Detektion der Inositolphosphate erfolgte durch eine der HPLC-Säule nachgeschalteten Säulenderivatisierung. Mittels Autosampler (AS50 Dionex) wurden jeweils 90 µl der Proben auf eine Anionenaustauschersäule (Mono-Q-5/50 GL Säule (Amersham) mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Die unterschiedlich phosphorylierten Inositolphosphate wurden durch einen Salzsäuregradienten (Gradientenpumpe GP40 (Dionex)) von der Säule eluiert und dann im Verhältnis 2:1 mit Eisen(III)-Nitrat-Perchlorsäure-Lösung (1 g  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  in 1000 ml 0,33 M  $\text{HClO}_4$ ) gemischt (post column reactor (Dionex)). Der Salzsäuregradient wurde mittels 0,005 M und 0,5 M Lösungen erzeugt. Dabei wurde innerhalb von 20 min die HCl-Konzentration bis auf 0,4 M in einem linearen Gradienten erhöht. Die Eisen(III)-nitrat-Perchlorsäure-Lösung wurde mit 0,5 ml/min unter Verwendung einer isokratischen Pumpe (IP20 Dionex) zum Eluat zugesetzt. Die Detektion (UV-Detektor AD25 (Dionex)) des derivatisierten Eluates erfolgte bei 290 nm. Die Daten wurden anschließend mit der Software Peaknet 6.3 (Dionex) und Chromeleon 6.7 (Dionex) ausgewertet und dokumentiert. Die Kalibrierung zur Bestimmung der Konzentration des Inositolhexakisphosphates wurde auf Grundlage der Analysen des Institutes für Biochemie und Molekularbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt und im Anhang unter 7.4 aufgeführt. Das HPIC-Programm wurde im Anhang unter 7.3 aufgeschrieben.

### **5.4.8.7 Wurzelmorphologie**

Die Analyse der Wurzel erfolgte mit Hilfe des Programms WinRhizo Pro 2005b (Regent Instruments Inc.).

#### **5.4.8.7.1 Spezifische Wurzellänge**

Zur Bestimmung der spezifischen Wurzellänge wurde die gesamte frische Wurzel in 1 cm lange Stücke geschnitten. Die Wurzelstücken wurden durchmischt und eine 500 mg Unterprobe gleichmäßig in einer mit destilliertem H<sub>2</sub>O gefüllten Plexiglaswanne verteilt. Der Scan der Wurzelstücken erfolgte mit dem Durchlichtscanner Epson Expression 1680 Modell EU-35. Die Auswertung fand mit dem Programm WinRhizo Pro 2005b statt. Bei der Berechnung wurde auf die Trockenmasse der Wurzel bezogen (Meter/g Trockenmasse).

#### **5.4.8.7.2 Gesamtwurzellänge**

Die Gesamtwurzellänge wurde mit dem Programm WinRhizo Pro 2005b (Regent Instruments Inc.) bestimmt. Sie errechnet sich aus dem Produkt von gemessener Wurzellänge der Unterprobe und Frischmasse der Gesamtwurzel geteilt durch die Frischmasse der Unterprobe.

#### **5.4.8.7.3 Durchschnittlicher Wurzeldurchmesser**

Der durchschnittliche Wurzeldurchmesser wurde ebenfalls mit dem Programm WinRhizo Pro 2005b (Regent Instruments Inc.) bestimmt. Er ergibt sich aus dem Quotienten aus Flächeninhalt der Wurzel und der gesamten Wurzellänge.

### **5.5 Software**

Der Text und die Tabellen wurden mit MS-Word2007 verfasst. Die Diagramme wurden mit MS-Excel2007 erstellt. Die Bildbearbeitung erfolgte mit Corel Graphics Essentials. Die digitale Bilddokumentation fand mit Syngene von Merck statt. Die Auswertung der photometrischen Messung erfolgte mit Ascent Software Version 2.6 von Thermo Scientific. Die Sequenzen wurde mit Vector NTI Version 9 von Invitrogen ausgewertet. Die Statistikanalysen wurden mit PASW Statistics 18 durchgeführt.





## 6 Referenzen

- Abranches, R., S. Marcel, et al. (2005). "Plants as bioreactors: a comparative study suggests that *Medicago truncatula* is a promising production system." J Biotechnol **120**(1): 121-34.
- Anderson, G. (1980). Assessing Organic Phosphorus in Soils. The Role of Phosphorus in Agriculture. M. Stelly. Madison, WI, American Society of Agronomy; Crop Science Society of America, Soil Science Society of America.
- Arcalis, E., S. Marcel, et al. (2004). "Unexpected deposition patterns of recombinant proteins in post-endoplasmic reticulum compartments of wheat endosperm." Plant Physiol **136**(3): 3457-66.
- Asmar, F. (1997). "Variation in activity of root extracellular phytase between genotypes of barley." Plant and Soil **195**(1): 61-64.
- Austin, A. J., C. E. Jones, et al. (1998). "Production of human tissue factor using the *Pichia pastoris* expression system." Protein Expr Purif **13**(1): 136-42.
- Baillie, L. W., P. Moore, et al. (1998). "A heat-inducible *Bacillus subtilis* bacteriophage phi 105 expression system for the production of the protective antigen of *Bacillus anthracis*." FEMS Microbiol Lett **163**(1): 43-7.
- Barber, S. A. and M. Silverbush (1984). Plant root morphology and nutrient uptake. Roots, Nutrient and Water Influx and Plant Growth. S. A. B. BARBER, D. R. (Ed.). Madison, Soil Science Society of America / Crop Science Society of America / American Society of Agronomy. **ASA. Special Publication, 49**: 65-88.
- Barrientos, L., J. J. Scott, et al. (1994). "Specificity of Hydrolysis of Phytic Acid by Alkaline Phytase from Lily Pollen." Plant Physiol. **106**(4): 1489-1495.
- Belcarz, A., G. Ginalska, et al. (2002). "The novel non-glycosylated invertase from *Candida utilis* (the properties and the conditions of production and purification)." Biochim Biophys Acta **1594**(1): 40-53.
- Berna, A. and F. Bernier (1997). "Regulated expression of a wheat germin gene in tobacco: oxalate oxidase activity and apoplastic localization of the heterologous protein." Plant Mol Biol **33**(3): 417-29.
- Bevan, M. (1984). "Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation." Nucl. Acids Res. **12**: 8711-8721.
- Bieleski, R. L. (1973). "Phosphate Pools, Phosphate Transport, and Phosphate Availability." Annual Review of Plant Physiology **24**(1): 225-252.
- Bilyeu, K. D., P. Zeng, et al. (2008). "Quantitative Conversion of Phytate to Inorganic Phosphorus in Soybean Seeds Expressing a Bacterial Phytase." Plant Physiol. **146**(2): 468-477.

- Bogar, B., G. Szakacs, et al. (2003). "Optimization of phytase production by solid substrate fermentation." J Ind Microbiol Biotechnol **30**(3): 183-9.
- Bogar, B., G. Szakacs, et al. (2003). "Production of phytase by *Mucor racemosus* in solid-state fermentation." Biotechnol Prog **19**(2): 312-9.
- Böhm, K., T. Herter, et al. (2010). "Crystal structure of *Klebsiella* sp. ASR1 phytase suggests substrate binding to a preformed active site that meets the requirements of a plant rhizosphere enzyme." FEBS Journal **277**(5): 1284-1296.
- Bohn, L., L. Josefsen, et al. (2007). "Quantitative analysis of phytate globoids isolated from wheat bran and characterization of their sequential dephosphorylation by wheat phytase." J Agric Food Chem **55**(18): 7547-52.
- Borisjuk, N. V., L. G. Borisjuk, et al. (1999). "Production of recombinant proteins in plant root exudates." Nat Biotechnol **17**(5): 466-9.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry **72**(1-2): 248-254.
- Brinch-Pedersen, H., F. Hatzack, et al. (2003). "Concerted action of endogenous and heterologous phytase on phytic acid degradation in seed of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.)." Transgenic Res **12**(6): 649-59.
- Brinch-Pedersen, H., F. Hatzack, et al. (2006). "Heat-stable phytases in transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.): deposition pattern, thermostability, and phytate hydrolysis." J Agric Food Chem **54**(13): 4624-32.
- Brinch-Pedersen, H., L. D. Sorensen, et al. (2002). "Engineering crop plants: getting a handle on phosphate." Trends Plant Sci **7**(3): 118-25.
- Brockmeier, U., M. Wendorff, et al. (2006). "Versatile Expression and Secretion Vectors for *Bacillus subtilis*." Current Microbiology **52**(2): 143-148.
- Bulmer, M. (1990). "The effect of context on synonymous codon usage in genes with low codon usage bias." Nucleic Acids Res **18**(10): 2869-73.
- Bumb, B. L. and C. A. Baanante (1996). The Role of Fertilizer in Sustaining Food Security and Protecting the Environment. . Food, Agriculture and the Environment Discussion paper 17. Washington DC, USA International Food Policy Research Institute.
- Burger, S., H. Tatge, et al. (2003). "Expression of recombinant *Clostridium difficile* toxin A using the *Bacillus megaterium* system." Biochem Biophys Res Commun **307**(3): 584-8.
- Carroll, P. V., U.-S. Claudia, et al. (2003). "Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource." New Phytologist **157**(3): 423-447.
- Chan, W. L., S. C. Lung, et al. (2006). "Properties of beta-propeller phytase expressed in transgenic tobacco." Protein Expr Purif **46**(1): 100-6.

- Chao, Y. P., W. Law, et al. (2002). "High production of heterologous proteins in *Escherichia coli* using the thermo-regulated T7 expression system." Appl Microbiol Biotechnol **58**(4): 446-53.
- Chen, R., G. Xue, et al. (2008). "Transgenic maize plants expressing a fungal phytase gene." Transgenic Res **17**(4): 633-43.
- Chen, S., D. Gray, et al. (2001). "Production of recombinant proteins in mammalian cells." Curr Protoc Protein Sci **Chapter 5**: Unit5 10.
- Cheryan, M. (1980). "Phytic acid interactions in food systems." Crit Rev Food Sci Nutr **13**(4): 297-335.
- Chiera, J. M., J. J. Finer, et al. (2004). "Ectopic expression of a soybean phytase in developing seeds of *Glycine max* to improve phosphorus availability." Plant Molecular Biology **56**(6): 895-904.
- Chimoy Effio, P., A. V. Folgueras-Flatschart, et al. (2003). "Expression of functional *Anopheles merus* alpha-amylase in the baculovirus/*Spodoptera frugiperda* system." Insect Mol Biol **12**(5): 415-25.
- Choi, E. S., J. H. Sohn, et al. (1994). "Optimization of the expression system using galactose-inducible promoter for the production of anticoagulant hirudin in *Saccharomyces cerevisiae*." Appl Microbiol Biotechnol **42**(4): 587-94.
- Christensen, A. H., R. A. Sharrock, et al. (1992). "Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation." Plant Mol Biol **18**(4): 675-89.
- Chu, H. M., R. T. Guo, et al. (2004). "Structures of *Selenomonas ruminantium* phytase in complex with persulfated phytate: DSP phytase fold and mechanism for sequential substrate hydrolysis." Structure **12**(11): 2015-24.
- Coello, P., J. P. Maughan, et al. (2001). "Generation of low phytic acid *Arabidopsis* seeds expressing an *E. coli* phytase during embryo development." Seed Science Research **11**(04): 285-291.
- Cosgrove, D. J. (1980). Inositolhexakisphosphates. Inositol Phosphates. Their Chemistry, Biochemistry and Physiology. D. J. Cosgrove, Elsevier Scientific Publishing Company Netherlands: 26-43.
- Dalal, R. C. (1977). "Soil organic phosphorus." Advances in Agronomy **29**: 83-77.
- Daniell, H., S. J. Streatfield, et al. (2001). "Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants." Trends Plant Sci **6**(5): 219-26.
- de Peyer, O. S., A. C. Wetten, et al. (1999). "A heterologous expression system for bovine lens transmembrane main intrinsic protein (MIP) in *Nicotiana tabacum* plants." Mol Vis **5**: 23.

- Deblaere, R., B. Bytebier, et al. (1985). "Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants." Nucleic Acids Res **13**(13): 4777-88.
- Dorsch, J. A., A. Cook, et al. (2003). "Seed phosphorus and inositol phosphate phenotype of barley low phytic acid genotypes." Phytochemistry **62**(5): 691-706.
- Duff, S. M., G. Sarath, et al. (1994). "The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism." Physiologia Plantarum **90**: 791-800.
- During, K., S. Hippe, et al. (1990). "Synthesis and self-assembly of a functional monoclonal antibody in transgenic *Nicotiana tabacum*." Plant Mol Biol **15**(2): 281-93.
- Dvorakova, J. (1998). "Phytase: sources, preparation and exploitation." Folia Microbiol (Praha) **43**(4): 323-38.
- Elkhalil, E. A. I. M. K. B. R. S. O. "In vitro and in vivo characteristics of bacterial phytases and their efficacy in broiler chickens." British Poultry Science(0007-1668).
- Faye, L. and M. J. Chrispeels (1989). "Apparent Inhibition of beta-Fructosidase Secretion by Tunicamycin May Be Explained by Breakdown of the Unglycosylated Protein during Secretion." Plant Physiol **89**(3): 845-851.
- Fennoy, S. L. and J. Bailey-Serres (1993). "Synonymous codon usage in *Zea mays* L. nuclear genes is varied by levels of C and G-ending codons." Nucleic Acids Res **21**(23): 5294-300.
- Florin, L., A. Pegel, et al. (2009). "Heterologous expression of the lipid transfer protein CERT increases therapeutic protein productivity of mammalian cells." J Biotechnol **141**(1-2): 84-90.
- Fuhrmann, M., A. Hausherr, et al. (2004). "Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene." Plant Mol Biol **55**(6): 869-81.
- Furihata, T., M. Suzuki, et al. (1992). "Kinetic characterization of two phosphate uptake systems with different affinities in suspension cultured *Catharanthus roseus* protoplasts." Plant and Cell Physiology **33**: 1151-1157.
- Gamer, M., D. Frode, et al. (2009). "A T7 RNA polymerase-dependent gene expression system for *Bacillus megaterium*." Appl Microbiol Biotechnol **82**(6): 1195-203.
- Ganal and Tanksley (1989). "Analysis of tomato DNA by pulsed field gel electrophoresis." Plant Molecular Biology Reporter **7**(1): 17-28.
- George, T. S., R. J. Simpson, et al. (2005). "Expression of a fungal phytase gene in *Nicotiana tabacum* improves phosphorus nutrition of plants grown in amended soils." Plant Biotechnol J **3**(1): 129-40.
- Geymonat, M., A. Spanos, et al. (2007). "A *Saccharomyces cerevisiae* autoselection system for optimised recombinant protein expression." Gene **399**(2): 120-8.

- Gilroy, S. and D. L. Jones (2000). "From form to function: root hair development and nutrient uptake." Trends in Plant Science **5**: 56-60.
- Golovan, S., G. Wang, et al. (2000). "Characterization and overproduction of the Escherichia coli appA encoded bifunctional enzyme that exhibits both phytase and acid phosphatase activities." Can J Microbiol **46**(1): 59-71.
- Golovan, S. P., M. A. Hayes, et al. (2001). "Transgenic mice expressing bacterial phytase as a model for phosphorus pollution control." Nat Biotechnol **19**(5): 429-33.
- Golovan, S. P., R. G. Meidinger, et al. (2001). "Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure." Nat Biotechnol **19**(8): 741-5.
- Greiner, R. and I. Egli (2003). "Determination of the activity of acidic phytate-degrading enzymes in cereal seeds." J Agric Food Chem **51**(4): 847-50.
- Greiner, R., E. Haller, et al. (1997). "Purification and characterization of a phytase from Klebsiella terrigena." Arch Biochem Biophys **341**(2): 201-6.
- Greiner, R., K. D. Jany, et al. (2000). "Identification and Properties of myo -Inositol Hexakisphosphate Phosphohydrolases (Phytases) from Barley (Hordeum vulgare)." Journal of Cereal Science **31**(2): 127-139.
- Greiner, R., B. L. Lim, et al. (2007). "Pathway of phytate dephosphorylation by beta-propeller phytases of different origins." Can J Microbiol **53**(4): 488-95.
- Ha, N. C., B. C. Oh, et al. (2000). "Crystal structures of a novel, thermostable phytase in partially and fully calcium-loaded states." Nat Struct Biol **7**(2): 147-53.
- Haefner, S., A. Knietzsch, et al. (2005). "Biotechnological production and applications of phytases." Appl Microbiol Biotechnol **68**(5): 588-97.
- Hahn, T., K. Tag, et al. (2006). "A novel estrogen sensor based on recombinant Arxula adenivorans cells." Biosens Bioelectron **21**(11): 2078-85.
- Hamada, J. (1996). "Isolation and identification of the multiple forms of soybean phytases." Journal of the American Oil Chemists' Society **73**(9): 1143-1151.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." Journal of Molecular Biology **166**(4): 557-580.
- Hatzack, F., K. S. Johansen, et al. (2000). "Nutritionally relevant parameters in low-phytate barley (hordeumvulgare L.) grain mutants." J Agric Food Chem **48**(12): 6074-80.
- Hayes, J., R. Simpson, et al. (2000). "The growth and phosphorus utilisation of plants in sterile media when supplied with inositol hexaphosphate, glucose 1-phosphate or inorganic phosphate." Plant and Soil **220**(1): 165-174.
- He, F., F. Huang, et al. (2007). "Protein storage vacuole acidification as a control of storage protein mobilization in soybeans." J Exp Bot **58**(5): 1059-70.

- He, M. X., H. Feng, et al. (2008). "Construction of a novel cell-surface display system for heterologous gene expression in *Escherichia coli* by using an outer membrane protein of *Zymomonas mobilis* as anchor motif." Biotechnol Lett **30**(12): 2111-7.
- Hensel, G. and J. Kumlehn (2004). Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) by co-culture of immature embryos with *Agrobacteria*
- Transgenic crops of the world - Essential protocols. I. S. E. CURTIS. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 35-44.
- Herter, T. (2009). Strukturelle und funktionelle Analysen von phytatspaltenden Enzymen aus Enterobacteriaceae. Biologie/ Bakteriengenetik, Humboldt-Universität Berlin.
- Hinsinger, P. (2001). "Bioavailability of soil inorganic phosphorus in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review." Plant Soil **237**: 173-195.
- Hood, E. E., S. B. Gelvin, et al. (1993). "New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants." Transgenic Research **2**(4): 208-218.
- Horsch, R. B., S. G. Rogers, et al. (1985). "Transgenic plants." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **50**: 433-7.
- Horvath, H., J. Huang, et al. (2000). "The production of recombinant proteins in transgenic barley grains." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(4): 1914-1919.
- Idriss, E. E., O. Makarewicz, et al. (2002). "Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect." Microbiology **148**(Pt 7): 2097-109.
- Igbasan, F. A., K. Manner, et al. (2000). "Comparative studies on the in vitro properties of phytases from various microbial origins." Arch Tierernahr **53**(4): 353-73.
- Jacobsen, J. V., R. B. Knox, et al. (1971). "The structure and composition of aleurone grains in the barley aleurone layer." Planta **101**(3): 189-209.
- Jensen, L. G., O. Olsen, et al. (1996). "Transgenic barley expressing a protein-engineered, thermostable (1,3-1,4)-beta-glucanase during germination." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(8): 3487-91.
- Jog, S. P., B. G. Garchow, et al. (2005). "Alkaline phytase from lily pollen: Investigation of biochemical properties." Arch Biochem Biophys **440**(2): 133-40.
- Kapila, J., R. De Rycke, et al. (1997). "An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves." Plant Science **122**(1): 101-108.
- Kawabe, A. and N. T. Miyashita (2003). "Patterns of codon usage bias in three dicot and four monocot plant species." Genes Genet Syst **78**(5): 343-52.
- Kay, R., A. Chan, et al. (1987). "Duplication of CaMV 35S Promoter Sequences Creates a Strong Enhancer for Plant Genes." Science **236**(4806): 1299-1302.

- Kerovuo, J., M. Lauraeus, et al. (1998). "Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*." Appl Environ Microbiol **64**(6): 2079-85.
- Kerovuo, J., J. Rouvinen, et al. (2000). "Analysis of myo-inositol hexakisphosphate hydrolysis by *Bacillus* phytase: indication of a novel reaction mechanism." Biochem J **352 Pt 3**: 623-8.
- Kim, C. H., Y. Oh, et al. (1997). "Codon optimization for high-level expression of human erythropoietin (EPO) in mammalian cells." Gene **199**(1-2): 293-301.
- Kim, H. W., Y. O. Kim, et al. (2003). "Isolation and characterization of a phytase with improved properties from *Citrobacter braakii*." Biotechnol Lett **25**(15): 1231-4.
- Kim, Y. O., J. K. Lee, et al. (1998). "Cloning of the thermostable phytase gene (phy) from *Bacillus* sp. DS11 and its overexpression in *Escherichia coli*." FEMS Microbiol Lett **162**(1): 185-91.
- Knop, J. A. L. W. (1884). Versuchsstationen. **30**: 293.
- Kocken, C. H. and A. W. Thomas (1996). "Rapid screening and mapping of conformational epitopes expressed in the secretion expression system *Pichia pastoris*." Anal Biochem **239**(1): 111-2.
- Komarnytsky, S., N. V. Borisjuk, et al. (2000). "Production of Recombinant Proteins in Tobacco Guttation Fluid." Plant Physiol. **124**(3): 927-934.
- Krebs, B., B. Hoding, et al. (1998). "Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. I. Activities and characterization of *Bacillus subtilis* strains." Journal of Plant Disease and Protection **105**(2): 181-197.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Larson, S. R., K. A. Young, et al. (1998). "Linkage Mapping of two mutations that reduce phytic acid content of barley grain." Theoretical Applied Genetics **97**: 141-146.
- Lazo, G. R., P. A. Stein, et al. (1991). "A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*." Biotechnology (N Y) **9**(10): 963-7.
- Leah, R., H. Tommerup, et al. (1991). "Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties." J Biol Chem **266**(3): 1564-73.
- Li, M., M. Osaki, et al. (1997). "Purification and characterization of phytase induced in tomato roots under phosphorus-deficient conditions." Soil Sci. Plant Nutr. **43**: 179-190.
- Li, M., M. Osaki, et al. (1997). "Secretion of phytase from the roots of several plant species under phosphorus-deficient conditions." Plant and Soil **195**(1): 161-169.

- Li, S. M., L. Li, et al. (2004). "Acid phosphatase role in chickpea/maize intercropping." Ann Bot **94**(2): 297-303.
- Liu, B.-L., A. Rafiq, et al. (1998). "The Induction and Characterization of Phytase and Beyond." Enzyme and Microbial Technology **22**(5): 415-424.
- Liu, K., K. L. Peterson, et al. (2007). "Comparison of the Phosphorus and Mineral Concentrations in Bran and Abraded Kernel Fractions of a Normal Barley (*Hordeum vulgare*) Cultivar versus Four Low Phytic Acid Isolines." Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**: 4453-4460.
- Loewus, F. A. and P. P. N. Murthy (2000). "*myo*-Inositol metabolism in plants." Plant Science **150**: 1-19.
- Lolas, G. M., N. Palamidis, et al. (1976). "Phytic acid-total phosphorus relationship in Barley, Oats, Soybeans and Wheat." Cereal Chemistry **53**(6): 867-871.
- Lott, J. N. A. (1984). Accumulation of seed reserves of phosphorus and other minerals. Seed Physiology. D. R. Murray, Academic Press: 139-166.
- Lott, J. N. A. (1995). Mechanisms and regulation of mineral nutrient storage during seed development. Seed Development and Germination. J. Kigel and G. Galili, Marcel Dekker: 215-235.
- Lott, J. N. A., I. Ockenden, et al. (2000). "Phytic acid and phosphorus in crop seeds and fruits: a global estimate." Seed Science Research **10**: 11-33.
- Loyola-Vargas, V. M. and F. Vazquez-Flota (2006). "An introduction to plant cell culture: Back to the future." Methods Mol Biol **318**: 3-8.
- Lung, S.-C. (2005). "Secretion of beta-propeller phytase from tobacco and Arabidopsis roots enhances phosphorus utilization." Plant Science **169**: 341-349.
- Lung, S.-C. and B. L. Lim (2005). "Assimilation of phytate-phosphorus by the extracellular phytase activity of tobacco (*Nicotiana tabacum*) is affected by the availability of soluble phytate." Plant and Soil **279**: 187-199.
- Lung, S. C., A. Leung, et al. (2008). "Phytase activity in tobacco (*Nicotiana tabacum*) root exudates is exhibited by a purple acid phosphatase." Phytochemistry **69**(2): 365-73.
- Lynch, J. P. and K. M. Brown (2001). "Topsoil foraging-an architectural adaptation of plants to low phosphorus." Plant and Soil **237**: 225-237.
- Maenz, D. D., C. M. Engele-Schaan, et al. (1999). "The effect of minerals and mineral chelators on the formation of phytase-resistant and phytase-susceptible forms of phytic acid in solution and in a slurry of canola meal " Animal Feed Science and Technology **81**(3): 177-192.
- Malten, M., R. Biedendieck, et al. (2006). "A *Bacillus megaterium* plasmid system for the production, export, and one-step purification of affinity-tagged heterologous levansucrase from growth medium." Appl Environ Microbiol **72**(2): 1677-9.



- Marschner, H., V. Römheld, et al. (1986). "Root induced changes in the rhizosphere: importance of mineral nutrition of plants." Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde **149**: 441-456.
- Martin, C. J. and W. J. Evans (1986). "Phytic acid-metal ion interactions. II. The effect of pH on Ca(II) binding." J Inorg Biochem **27**(1): 17-30.
- Martin, J. A., R. A. Murphy, et al. (2006). "Purification and physico-chemical characterisation of genetically modified phytases expressed in *Aspergillus awamori*." Bioresour Technol **97**(14): 1703-8.
- Maugenest, S., I. Martinez, et al. (1999). "Structure of two maize phytase genes and their spatio-temporal expression during seedling development." Plant Mol Biol **39**(3): 503-14.
- McLaughlin, M. J., T. G. Baker, et al. (1990). "Distribution and forms of phosphorus and aluminum in acidic topsoils under pastures in south-eastern Australia." Australian Journal of Soil Research **28**(3): 371-385.
- Meldgaard, M. and I. Svendsen (1994). "Different effects of N-glycosylation on the thermostability of highly homologous bacterial (1,3-1,4)-beta-glucanases secreted from yeast." Microbiology **140** ( Pt 1): 159-66.
- Miksch, G., S. Kleist, et al. (2002). "Overexpression of the phytase from *Escherichia coli* and its extracellular production in bioreactors." Appl Microbiol Biotechnol **59**(6): 685-94.
- Miyamoto, C., G. E. Smith, et al. (1985). "Production of human c-myc protein in insect cells infected with a baculovirus expression vector." Mol Cell Biol **5**(10): 2860-5.
- Mullaney, E. J. and A. H. Ullah (2003). "The term phytase comprises several different classes of enzymes." Biochem Biophys Res Commun **312**(1): 179-84.
- Nakamura, Y., T. Gojobori, et al. (2000). "Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000." Nucleic Acids Res **28**(1): 292.
- Nandi, S. K., R. C. Pant, et al. (1987). "Multiphasic uptake of phosphate by corn roots." Plant Cell and Environment **10**: 463-474.
- Nemoto, T., J. Maruyama, et al. (2009). "Improvement of heterologous protein production in *Aspergillus oryzae* by RNA interference with alpha-amylase genes." Biosci Biotechnol Biochem **73**(11): 2370-3.
- O'Dell, B. L., A. R. De Boland, et al. (1972). "Distribution of phytate and nutritionally important elements among the morphological components of cereal grains." Journal of Agricultural and Food Chemistry **20**(3): 718-723.
- Odell, J. T., F. Nagy, et al. (1985). "Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter." Nature **313**(6005): 810-2.
- Oh, B. C., B. S. Chang, et al. (2001). "Calcium-dependent catalytic activity of a novel phytase from *Bacillus amyloliquefaciens* DS11." Biochemistry **40**(32): 9669-76.

- Oh, B. C., M. H. Kim, et al. (2006). "Ca(2+)-inositol phosphate chelation mediates the substrate specificity of beta-propeller phytase." Biochemistry **45**(31): 9531-9.
- Osborne, L. D. and Z. Rengel (2002). "Growth and P uptake by wheat genotypes supplied with phytate as the only P source." Australian Journal of Agricultural Research **53**(7): 845-850.
- Outchkourov, N. S., B. Rogelj, et al. (2003). "Expression of sea anemone equistatin in potato. Effects of plant proteases on heterologous protein production." Plant Physiol **133**(1): 379-90.
- Petrov, P., E. Jay, et al. (1987). "Inclusion bodies in recombinant E. coli producing human calcitonin tetramer, as visualized by immuno-gold electron microscopy." Biol Cell **61**(1-2): 1-4.
- Pickering, R., R. E. Niks, et al. (2004). "Importance of the Secondary Gene pool in Barley Genetics and Breeding II. Disease Resistance, Agronomic Performance and Quality." Czech Journal of Genetics and Plant Breeding **40**(3): 79-85.
- Plaxton, W. C. and M. C. Carswell (1999). Metabolic aspects of the phosphate starvation response in plants. Plant responses to environmental stress: from phytohormones to genome reorganization. H. R. Lerner. New York, USA: Marcel-Dekker: 350-372.
- Plesha, M. A., T. K. Huang, et al. (2009). "Optimization of the bioprocessing conditions for scale-up of transient production of a heterologous protein in plants using a chemically inducible viral amplicon expression system." Biotechnol Prog **25**(3): 722-34.
- Powar, V. K. and V. Jagannathan (1967). "Phytase from Bacillus subtilis." Indian J Biochem **4**(3): 184-5.
- Puhl, A. A., R. J. Gruninger, et al. (2007). "Kinetic and structural analysis of a bacterial protein tyrosine phosphatase-like myo-inositol polyphosphatase." Protein Sci **16**(7): 1368-78.
- Purvis, I. J., D. Chotai, et al. (1991). "An androgen-inducible expression system for Saccharomyces cerevisiae." Gene **106**(1): 35-42.
- Raboy, V. (1997). Accumulation and storage of phosphate and minerals. Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development. B. A. Larskins and I. K. Vasil, Kluwer Academic Publishers: 441-477.
- Raboy, V. (2003). "Molecules of interest myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate." Phytochemistry **64**: 1033-1043.
- Raboy, V. (2007). "Forward genetics studies of seed phytic acid." Israel Journal of Plant Sciences **55**(2): 171-181.
- Raboy, V. and P. Gerbasi (1996). "Genetics of myo-inositol phosphate synthesis and accumulation." Subcell Biochem **26**: 257-85.
- Raboy, V., P. F. Gerbasi, et al. (2000). "Origin and seed phenotype of maize low phytic acid 1-1 and low phytic acid 2-1." Plant Physiol **124**(1): 355-68.

- Raghothama, K. G. (1999). "Phosphate Acquisition." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **50**: 665-693.
- Raghothama, K. G. (2000). "Phosphate transport and signaling." Current Opinion in Plant Biology **3**: 182-187.
- Rao, D. E., K. V. Rao, et al. (2008). "Cloning and expression of Bacillus phytase gene (phy) in Escherichia coli and recovery of active enzyme from the inclusion bodies." J Appl Microbiol **105**(4): 1128-37.
- Rapoport, S., E. Leva, et al. (1941). "PHYTASE IN PLASMA AND ERYTHROCYTES OF VARIOUS SPECIES OF VERTEBRATES." Journal of Biological Chemistry **139**(2): 621-632.
- Rasmussen, S. K. and F. Hatzack (1998). "Identification of low-phytate barley (Hordeum vulgare L.) grain mutants by TLC and genetic analysis." Hereditas **129**: 107-112.
- Richardson, A. E., P. A. Hadobas, et al. (2001). "Extracellular secretion of Aspergillus phytase from Arabidopsis roots enables plants to obtain phosphorus from phytate." Plant J **25**(6): 641-9.
- Richardson, A. E., P. A. Hadobas, et al. (2001). "Utilization of phosphorus by pasture plants supplied with myo-inositol hexaphosphate is enhanced by the presence of soil micro-organisms." Plant and Soil **229**(1): 47-56.
- Roberts, I. N., D. J. Jeenes, et al. (1992). "Heterologous gene expression in Aspergillus niger: a glucoamylase-porcine pancreatic prophospholipase A2 fusion protein is secreted and processed to yield mature enzyme." Gene **122**(1): 155-61.
- Rodriguez, E., E. J. Mullaney, et al. (2000). "Expression of the Aspergillus fumigatus phytase gene in Pichia pastoris and characterization of the recombinant enzyme." Biochem Biophys Res Commun **268**(2): 373-8.
- Roth, A. H. and P. Dersch (2009). "A novel expression system for intracellular production and purification of recombinant affinity-tagged proteins in Aspergillus niger." Appl Microbiol Biotechnol.
- Runge-Metzger, A. (1995). Closing the cycle: Obstacles to efficient P management for improved global food security. Phosphorus in the global environment: Transfers, cycles and management. H. Thiessen. New York, John Wiley & Sons: 27-42.
- Rygas, T. and W. Hillen (1991). "Inducible high-level expression of heterologous genes in Bacillus megaterium using the regulatory elements of the xylose-utilization operon." Appl Microbiol Biotechnol **35**(5): 594-9.
- Sajidan, A., A. Farouk, et al. (2004). "Molecular and physiological characterisation of a 3-phytase from soil bacterium Klebsiella sp. ASR1." Appl Microbiol Biotechnol **65**(1): 110-8.
- Sano, K., H. Fukuhara, et al. (1999). "Phytase of the yeast Arxula adenivorans." Biotechnology Letters **21**: 33-38.

- Schachtman, D. P., R. J. Reid, et al. (1998). "Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell." Plant Physiol **116**(2): 447-453.
- Scott, J. J. and F. A. Loewus (1986). "A Calcium-Activated Phytase from Pollen of *Lilium longiflorum*." Plant Physiol **82**(1): 333-335.
- Shah, V. and L. J. Parekh (1990). "Phytase from *Klebsiella* Sp. No. PG-2: purification and properties." Indian J Biochem Biophys **27**(2): 98-102.
- Sharp, P. M. and W. H. Li (1987). "The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications." Nucleic Acids Res **15**(3): 1281-95.
- Shatzman, A. R. and M. Rosenberg (1986). "Efficient expression of heterologous genes in *Escherichia coli*. The pAS vector system and its applications." Ann N Y Acad Sci **478**: 233-48.
- Shi, J., H. Wang, et al. (2003). "The maize low-phytic acid mutant *lpa2* is caused by mutation in an inositol phosphate kinase gene." Plant Physiol **131**(2): 507-15.
- Shieh, T. R. and J. H. Ware (1968). "Survey of microorganism for the production of extracellular phytase." Appl Microbiol **16**(9): 1348-51.
- Shin, S., N. C. Ha, et al. (2001). "Enzyme mechanism and catalytic property of beta propeller phytase." Structure **9**(9): 851-8.
- Smith, F. W., A. L. Rae, et al. (2000). "Molecular mechanisms of phosphate and sulfate transport in plants." Biochimica et Biophysica Acta **1465**: 236-245.
- Srinivasan, G. and E. B. Thompson (1990). "Overexpression of full-length human glucocorticoid receptor in *Spodoptera frugiperda* cells using the baculovirus expression vector system." Mol Endocrinol **4**(2): 209-16.
- Takimoto, I., A. H. Christensen, et al. (1994). "Non-systemic expression of a stress-responsive maize polyubiquitin gene (*Ubi-1*) in transgenic rice plants." Plant Molecular Biology **26**(3): 1007-1012.
- Tenger, K., P. Khoroshyy, et al. (2007). "Improved system for heterologous expression of cytochrome c mutants in *Escherichia coli*." Acta Biol Hung **58 Suppl**: 23-35.
- Thornewell, S. J., A. K. East, et al. (1993). "An efficient expression and secretion system based on *Bacillus subtilis* phage phi 105 and its use for the production of *B. cereus* beta-lactamase I." Gene **133**(1): 47-53.
- Tull, D., T. E. Gottschalk, et al. (2001). "Extensive N-glycosylation reduces the thermal stability of a recombinant alkalophilic bacillus alpha-amylase produced in *Pichia pastoris*." Protein Expr Purif **21**(1): 13-23.
- Turnbull, I. F., D. R. Smith, et al. (1990). "Expression and secretion in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus niger* of a cell surface glycoprotein from the cattle tick, *Boophilus microplus*, by using the fungal *amdS* promoter system." Appl Environ Microbiol **56**(9): 2847-52.

- Uhde-Stone, C., G. Gilbert, et al. (2003). "Adaptation of white lupin to phosphorus deficiency involves expression of genes related to organic acid metabolism." Plant and Soil **a**.
- Uhde-Stone, C., K. E. Zinn, et al. (2003). "Nylon filter arrays reveal differential gene expression in proteoid roots of white lupin in response to phosphorus deficiency." Plant Physiology **131**.
- Ullah, A. H., B. J. Cummins, et al. (1991). "Cyclohexanedione modification of arginine at the active site of *Aspergillus ficuum* phytase." Biochem Biophys Res Commun **178**(1): 45-53.
- Ullah, A. H., K. Sethumadhavan, et al. (2000). "Biochemical characterization of cloned *Aspergillus fumigatus* phytase (phyA)." Biochem Biophys Res Commun **275**(2): 279-85.
- Ullrich, C. and A. Novacky (1990). "Extra- and intracellular pH and membrane potential changes induced by  $K^+$ ,  $Cl^-$ ,  $H_2PO_4^-$  and  $NO_3^-$  uptake and fusicoccin in root hairs of *Limnobium stoloniferum*." Plant Physiology **94**: 1561-1567.
- Vance, C. P. (2001). "Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources." Plant Physiol **127**(2): 390-7.
- Verwoerd, T. C., P. A. van Paridon, et al. (1995). "Stable accumulation of *Aspergillus niger* phytase in transgenic tobacco leaves." Plant Physiol **109**(4): 1199-205.
- Volfova, O., J. Dvorakova, et al. (1994). "Phytase from *Aspergillus niger*." Folia Microbiol (Praha) **39**(6): 481-4.
- Wang, L. and M. J. Roossinck (2006). "Comparative analysis of expressed sequences reveals a conserved pattern of optimal codon usage in plants." Plant Mol Biol **61**(4-5): 699-710.
- Wang, X., Y. Wang, et al. (2009). "Overexpressing AtPAP15 enhances phosphorus efficiency in soybean." Plant Physiol **151**(1): 233-40.
- Wartmann, T., R. Stoltenburg, et al. (2003). "The ALEU2 gene--a new component for an *Arxula adeninivorans*-based expression platform." FEMS Yeast Res **3**(2): 223-32.
- Williams, C. H. and G. Anderson (1968). "Inositol phosphates in some Australian soils." Australian Journal of Soil Research **6**(1): 121-130.
- Williams, D. C., R. M. Van Frank, et al. (1982). "Cytoplasmic inclusion bodies in *Escherichia coli* producing biosynthetic human insulin proteins." Science **215**(4533): 687-9.
- Wu, S., A. Druka, et al. (2000). "Functional characterization of seed coat-specific members of the barley germin gene family." Plant Physiology and Biochemistry **38**(9): 685-698.

- Wyss, M., R. Brugger, et al. (1999). "Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties." Appl Environ Microbiol **65**(2): 367-73.
- Wyss, M., L. Pasamontes, et al. (1999). "Biophysical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance." Appl Environ Microbiol **65**(2): 359-66.
- Yanke, L. J., H. D. Bae, et al. (1998). "Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria." Microbiology **144** ( Pt 6): 1565-73.
- Yao, B., T. Z. Yuan, et al. (2001). "[Cloning of neutral phytase gene nphy from *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*]." Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao **17**(1): 11-5.
- Yaver, D. S., M. Lamsa, et al. (2000). "Using DNA-tagged mutagenesis to improve heterologous protein production in *Aspergillus oryzae*." Fungal Genet Biol **29**(1): 28-37.
- Yip, W., L. Wang, et al. (2003). "The introduction of a phytase gene from *Bacillus subtilis* improved the growth performance of transgenic tobacco." Biochem Biophys Res Commun **310**(4): 1148-54.
- Zhang, A. L., J. X. Luo, et al. (2009). "Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*." Mol Biol Rep **36**(6): 1611-9.
- Zhang, L., L. An, et al. (2005). "Properties of *A. ficuum* AS3.324 phytase expressed in tobacco." Process Biochemistry **40**(1): 213-216.
- Zhou, F., Z. Zhang, et al. (1998). "Molecular characterization of the oxalate oxidase involved in the response of barley to the powdery mildew fungus." Plant Physiol **117**(1): 33-41.
- Zimmermann, P., G. Zardi, et al. (2003). "Engineering the root-soil interface via targeted expression of a synthetic phytase gene in trichoblasts." Plant Biotechnology Journal **1**(5): 353-360.

## 7 Anhang

### 7.1 Miniplasmidpräparation

Aus 5 ml einer Übernacht (ÜN)-Kultur wird mittels Minipräparation die Plasmid-DNA isoliert. 1,5 ml der ÜN-Kultur werden 5 min bei 8000 U/min abzentrifugiert. Das Pellet wird durch starkes vortexen in 100 µl Puffer P1 resuspendiert. 200 µl Puffer P2 (Lysispuffer) werden zugegeben und nur leicht zum Mischen geschwenkt. 150 µl Puffer P3 werden dazugegeben. Das Gemisch wird 20 min bei –20 °C gelagert und anschließend mit 13000 rpm 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Eppendorf-Tube überführt und mit 3 Volumen 96 %igem Ethanol bei –80 °C 30 min gefällt. Das Pellet wird mit 70 %igem Ethanol versetzt und ohne vorher zu vortexen gleich bei 13000 rpm 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wird bei 37 °C solange getrocknet bis es frei von Ethanol ist. Das Pellet wird in 30 µl H<sub>2</sub>O mit RNase aufgelöst.

### 7.2 Lösungen für die Transformation von *Nicotiana tabacum*

**Tabelle 58:** Stocklösungen der verwendeten Wachstumshormone

WACHSTUMSHORMON	KONZENTRATION DER STAMMLÖSUNG
• 6-Benzylaminopurin	1 mg/ml
Naphtylessigsäure	1 mg/ml

**Tabelle 59 :** Medien für die Regeneration von *Nicotiana tabacum* Pflanzen nach der Transformation mit *Agrobacterium tumefaciens*

MS-MEDIUM-AGARPLATTEN ZUR REGENERATION VON KALLI UND HEMMUNG DES WACHSTUMS VON <i>AGROBACTERIUM</i> -ZELLEN
30 g Saccharose 8 g Agar 0,05 g 6-Benzylaminopurin 100 mg Combactam® 100 mg Ticarcillin 4,4 g MS-Medium ad 1 l dest. H <sub>2</sub> O
MS-Medium-Agarplatten zur Selektion der transformierten Kalli
30 g Saccharose

8 g Agar 0,05 g 6-Benzylaminopurin 100 mg Combactam® 100 mg Ticarcillin 100 mg Kanamycin bzw. 150 mg/l Kanamycin 4,4 g MS-Medium ad 1 l dest. H <sub>2</sub> O
<b>MS-Medium-Agarplatten zur Regeneration von Wurzeln</b>
30 g Saccharose 8 g Agar 0,1 mg Naphtylessigsäure 100 mg Combactam® 100 mg Ticarcillin 100 mg Kanamycin 4,4 g MS-Medium ad 1 l dest. H <sub>2</sub> O

### 7.3 Programm der HPIC-Analysen

**Tabelle 60** : Programm zur Bestimmung von IP6-IP2 mit Nachsäulenaddition mit Eisen(III)-Nitrat-Perchlorsäurelösung

Pump.Pressure.UpperLimit = 3500 Pump.Pressure.LowerLimit = 0 Pump.%A.Equate = "%A" %B.Equate = "%B" %C.Equate = "%C" %D.Equate = "%D" Pump_IP20.Pressure.UpperLimit = 1000 Pump_IP20.Pressure.LowerLimit = 0 Pump_IP20.%A.Equate = "Deri.lsg." Flush Volume = 500 Wait FlushState NeedleHeight = 0 CutSegmentVolume = 0 SyringeSpeed = 3 TrayTemperature = Off Cycle = 0 UV.Data_Collection_Rate = 5.00 UV.Rise_Time = 1.0 Wavelength = 290 UV_Lamp = On Visible_Lamp = On
--



```
WaitForTemperature = False
Wait SamplePrep
Pump_IP20.Flow = 0.5
-0.500 UV.Autozero
0.000 Pump.Flow = 1
    %B = 0.0
    %C = 0.0
    %D = 0.0
    Curve = 5

Load
    Wait CycleTimeState
    Inject
    Wait InjectState
    UV_VIS_1.AcqOn
    Pump.Flow = 1
    %B = 0.0
    %C = 0.0
    %D = 0.0
    Curve = 5
20.000 Pump.Flow = 1
    %B = 80.0
    %C = 0.0
    %D = 0.0
    Curve = 5
22.000 Pump.Flow = 1
    %B = 80.0
    %C = 0.0
    %D = 0.0
    Curve = 5
24.000 Pump.Flow = 1
    %B = 0.0
    %C = 0.0
    %D = 0.0
32.000 UV_VIS_1.AcqOff
    Pump.Flow = 1
    %B = 0.0
    %C = 0.0
    %D = 0.0
    Curve = 5
End
```

## 7.4 Kalibrierung der HPIC

**Tabelle 61 :** Kalibrierung nach Natuphos Analyse und Konzentrationsbestimmungen [ $\mu\text{M}$ ] der durch die *Aspergillus*-Phytase (Natuphos) generierten Phytatabbauprodukte

NATUPHOS	KS001: N0+	KS002: N15+	KS003: N45+	KS004: N90+	KS005: N120+
min	0	15	45	90	120
DL-Ins (1,2)P2	0	0	0	20,6632007 7	77,7905813 1
DL- Ins(1,2,6)P3/DL -Ins(1,2,4)P3	0	4,25768718 5	65,8004558 4	279,888339	319,413729 7
DL- Ins(1,2,4,5)P4	0	8,26484267 5	50,2765956	90,6951123 1	73,9205847 8
DL- Ins(1,2,5,6)P4	4,12724417	28,3168162 1	125,252181 7	183,814669 6	205,488364 6
I(1,4,5,6)P4	0	0	0,27082331 1	0,32324946 3	0
DL- Ins(1,2,3,4,6)P5	1,99857876 7	1,33280527 4	0,63335576 7	0,58649128 5	0,63979179 9
DL- Ins(1,2,3,4,5)P5	8,75326843 2	25,2616701 5	29,4332501 9	17,2090806 6	11,7490452 6
DL- Ins(1,2,4,5,6)P5	16,5823052 8	240,667627 2	367,047430 3	284,570038	229,241480 1
DL- Ins(1,3,4,5,6)P5	0,43071296 1	0	0	0	0
IP6	970,436973 3	693,762048 8	361,882579 4	136,626814 1	82,1829502 9
Summe [ $\mu\text{M}$ ]	1000	1000	1000	1000	1000

---

## Veröffentlichungen

- Idriss EE, Makarewicz O, Farouk A., Rosner K, Greiner R, Bochow H, Richter T, Borriss R. (2002). Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. Microbiology **48**: 2097-2109.
- Zwei Veröffentlichungen von Teilen dieser Arbeit mit Kristin Dietel als Erstautor sind in Vorbereitung.



---

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rainer Borriss für die Überlassung dieses interessanten Themas, für die Betreuung und die stete Diskussionsbereitschaft bedanken.

Den Arbeitsgruppen Bakteriengenetik (HU-Berlin), Molekulare Zellbiologie (IPK-Gatersleben) Pflanzliche Reproduktionsbiologie (IPK-Gatersleben), Pflanzenernährung und Düngung (HU-Berlin) und Molecular Plant Sciences (Washington State University) möchte ich für die Unterstützung und das nette Arbeitsklima danken.

Mein herzlicher Dank für die Hilfe bei der Arbeit mit den Pflanzen gilt Melanie Ruff, Carmen Wolfram-Wienberg, Nathalie Söthe und Cornelia Marthe.

Danken möchte ich Christiane Müller für die seelische, moralische und intensive technische Unterstützung.

Oliwia Makarewicz und Thomas Herter danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft und die nette Zusammenarbeit.

Meinen Eltern bin ich dankbar für die Ermöglichung meines Studiums und die Unterstützung in jeder Situation. Meiner Familie sage ich danke für die Geduld und den Beistand, den sie mir immer gewährt hat.



---

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Berlin, 19.02.2010

Kristin Dietel